



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Doctorado en Biociencias Moleculares

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
MUTACIONES DE SPLICING EN PACIENTES
CON HIPERFENILALANINEMIA;
APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS
ESPECÍFICAS DE RNA**

TESIS DOCTORAL

Ainhoa Martínez Pizarro

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES DE SPLICING EN PACIENTES CON HIPERFENILALANINEMIA; APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS ESPECÍFICAS DE RNA

Memoria presentada por la licenciada en Bioquímica

Ainhoa Martínez Pizarro

Para optar al grado de doctor en Biociencias Moleculares

en la modalidad de doctorado internacional

Trabajo realizado bajo la supervisión y dirección de:

Dra. Lourdes Ruiz Desviat

Profesor titular del Departamento de Biología Molecular

Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM) y en una estancia corta en el departamento de *Biochemistry and Molecular Biology* de la *University of Southern Denmark* (Odense, Denmark). Este trabajo ha sido posible gracias a un contrato con cargo a un proyecto de la Fundación Ramón Areces (XVII CN) y a la ayuda para estancias breves (*short term scientific mission*) de la Acción COST BM1207.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	7
1. Enfermedades Metabólicas Hereditarias	9
2. Hiperfenilalaninemias	10
2.1. Deficiencia en PAH: Fenilcetonuria	12
2.1.1. Diagnóstico y clasificación	13
2.1.2. Presentación clínica	14
2.1.3. Tratamiento y terapias en investigación	15
2.2. Defectos en BH ₄	17
2.2.1. Deficiencia en PTPS	17
2.2.1.1. Diagnóstico y clasificación	18
2.2.1.2. Presentación clínica	18
2.2.1.3. Tratamiento	19
3. Mecanismo de <i>splicing</i>	20
3.1. Alteraciones en el mecanismo de <i>splicing</i>	22
3.2. Estrategias para la modulación del <i>splicing</i>	24
3.2.1. Oligonucleótidos antisentido	24
3.2.1.1. Los minicírculos como vehículo para los AONs	26
3.2.2. Sobreexpresión de U1 snRNA	28
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Materiales	37
1.1. Pacientes y líneas celulares	37
1.2. Cepas bacterianas	37
1.3. Vectores plasmídicos	38
1.4. Reactivos y otros materiales	38
1.5. Anticuerpos	41
1.6. Oligonucleótidos	41
1.7. Equipos	44
1.8. Soporte informático y análisis <i>in silico</i>	45
2. Métodos	47
2.1. Obtención de micro-minicírculos	47
2.1.1. Construcción del vector	47

2.1.2. Generación de bacterias competentes	47
2.1.3. Producción de miMCs	47
2.2. Técnicas de ácidos nucleicos	48
2.2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos	48
2.2.2. Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos	48
2.2.3. Amplificación de gDNA y cDNA	49
2.2.4. Purificación de productos de PCR y secuenciación	49
2.2.5. Mutagénesis dirigida	49
2.2.6. Clonación y análisis de minigenes	50
2.2.7. Secuenciación masiva	50
2.3. Técnicas de proteínas	51
2.3.1. Detección de proteínas unidas a RNA (<i>RNA affinity</i>)	51
2.3.2. Separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE	51
2.3.3. Tinción con Coomassie	51
2.3.4. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas	52
2.4. Cultivos celulares	52
2.4.1. Mantenimiento de cultivos	52
2.4.2. Transfecciones	53
2.4.2.1. Transfecciones de AONs tipo PMO, VPMO y 2'OMePS	53
2.5. Análisis estadístico	54
RESULTADOS	55
1. Análisis funcional y aproximaciones terapéuticas para nuevas variantes de <i>splicing</i> identificadas en el gen <i>PTS</i>	57
1.1. Estudio del perfil transcripcional en fibroblastos de un paciente con deficiencia en PTPS	57
1.2. Análisis funcional de las nuevas variantes mediante minigenes	58
1.3. Exclusión de pseudoexones con AONs	59
1.4. Corrección del <i>exon skipping</i> por sobreexpresión de un U1 snRNA adaptado	61
2. Uso de miMCs como estrategia de vehiculización de AONs	63
2.1. Producción de los miMCs	63
2.2. Uso de los miMCs para la inducción del <i>skipping</i> del exón 11 del gen <i>PAH</i>	65
3. Identificación y análisis de variantes intrónicas profundas en el gen <i>PAH</i>	67
3.1. Identificación y selección de variantes intrónicas profundas	67
3.2. Análisis funcional de las variantes intrónicas profundas por minigenes	70
4. Análisis funcional de mutaciones de <i>splicing</i> en el gen <i>PAH</i>	72

4.1. Identificación de mutaciones y predicción <i>in silico</i> de su efecto	72
4.2. Análisis funcional mediante el uso de minigenes	73
4.3. Sobreexpresión de factores de <i>splicing</i>	75
4.4. Detección de proteínas unidas al RNA (<i>RNA affinity</i>)	76
4.5. Análisis del sitio 5' crítico de <i>splicing</i>	78
4.6. Sobreexpresión de U1 snRNAs adaptados	80
DISCUSIÓN	83
1. Uso de miMCs como estrategia de vehiculización de AONs	85
2. Identificación y análisis de variantes intrónicas profundas en el gen <i>PAH</i>	88
3. Análisis funcional y aproximaciones terapéuticas para nuevas variantes de <i>splicing</i> en HFA	90
CONCLUSIONES	97
CONCLUSIONS	101
BIBLIOGRAFÍA	105
PUBLICACIONES	121

2'-MOEPs	2'-O-metoxietil-fosforotioato
2'-OMePS	2'-O-metil-fosforotioato
5HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HTP	5-hidroxitriptófano
6-PTP	6-piruvoil-tetrahidropterina
AAV	Virus adenoasociado
AON	Oligonucleótido antisentido
AR	Aldosa reductasa
BH₄	Tetrahidrobiopterina
Bio	Biopterina
CR	Carbonilo reductasa
DBS	Muestras de sangre en papel (<i>dried blood spots</i>)
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHPR	Dihidropteridina reductasa
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
EMH	Enfermedad metabólica hereditaria
ESE	<i>Exonic splicing enhancers</i>
ESS	<i>Exonic splicing silencers</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GTP	Guanosina trifosfato
GTPCH I	Guanosina trifosfato ciclohidrolasa I
HFA	Hiperfenilalaninemia
hnRNP	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares
HVA	Ácido homovanílico
ISE	<i>Intronic splicing enhancers</i>
ISS	<i>Intronic splicing silencers</i>
LB	Luria broth
LCR	Líquido cefalorraquídeo
L-DOPA	Levodopa
LINE	<i>Long interspersed nuclear elements</i>
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
LNAA	Aminoácidos neutros largos
MC	Minicírculo

miMC	Micro-minicírculo
Neo	Neopterina
NGS	Secuenciación masiva (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NH2TP	7,8-dihidroneopterina trifosfato
NMD	<i>Nonsense Mediated Decay</i>
NOS	Sintasas de óxido nítrico
PAH	Fenilalanina hidroxilasa
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PCD	Pterina-4 α -carbinolamina deshidratasa
PEG	Polietilenglicol
Phe	Fenilalanina
PKU	Fenilcetonuria
PMO	Morfolino
Pri	Primapterina
PS	Fosforotioato
PTS/PTPS	6-piruvil-tetrahidropterina sintasa
RNA-seq	Secuenciación de RNA/transcriptomas (<i>RNA sequencing</i>)
SINE	<i>Short interspersed nuclear elements</i>
SMA	Atrofia muscular espinal
SNC	Sistema nervioso central
snRNA	RNA nuclear pequeño (<i>small nuclear RNA</i>)
snRNP	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
SNV	Variante de un solo cambio nucleotídico (<i>Single nucleotide variant</i>)
SR	Proteínas ricas en serina y arginina
SR	Sepiapterina reductasa
SSO	<i>Splice-switching antisense oligonucleotide</i>
TES	<i>Targeted exome sequencing</i>
Tyr	Tirosina
VPMO	Vivo-morfolino
WT	<i>Wild-type</i>

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de mutaciones de *splicing* que resultan en hiperfenilalaninemia (HFA), bien por defectos en la enzima 6-piruvil-tetrahidropterina sintasa (PTPS) que causa la deficiencia de tetrahidrobiopterina (BH₄), cofactor de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos, o bien por defectos en una de dichas hidroxilasas, la fenilalanina hidroxilasa (PAH).

Por una parte, hemos estudiado dos nuevas variantes, c.164-672C>T y c.243+3A>G en el gen *PTS* identificadas en un paciente HFA debido a un defecto en la enzima PTPS. La variante intrónica profunda c.164-672C>T crea un potencial sitio 5' de *splicing* que, según los análisis en fibroblastos del paciente y en minigenes, conduce a la inclusión de varios pseudoexones entre los exones 2 y 3 del mRNA del gen *PTS*. Este efecto pudo ser parcialmente revertido mediante oligonucleótidos antisentido (AONs) de diferente química. La variante c.243+3A>G afecta al sitio natural 5' de *splicing* del exón 4 resultando en el *skipping* del mismo. La sobreexpresión de un U1 snRNA adaptado, perfectamente complementario al sitio 5' de *splicing* mutante, permitió recuperar el transcrito normal en el sistema de minigenes, no así en fibroblastos, siendo necesario la optimización futura de esta estrategia.

Con el propósito de mejorar la aplicación de la terapia antisentido se ha estudiado un nuevo método de vehiculización de AONs, los micro-minicírculos (miMCs), vectores plasmídicos compuestos solamente por secuencias eucariotas. Para testar la eficacia de los miMCs se utilizó un plásmido parental que expresaba la fusión U7 snRNA-AON dirigido al sitio natural 5' de *splicing* del exón 11 del gen *PAH* con el fin de forzar la exclusión de dicho exón. Los resultados obtenidos tras la producción de los miMCs y la posterior transfección en una línea de hepatoma revelaron una baja eficiencia de los miMCs como vehículo para la terapia con AONs en nuestro modelo experimental, ya que sólo se observó un *skipping* parcial del exón 11.

Por otra parte, el uso de la secuenciación masiva para la captura completa del gen *PAH* en 7 pacientes con HFA en los que solo se les había encontrado una mutación *PAH* nos permitió identificar variantes intrónicas profundas. La interpretación de las variantes mediante un sistema de priorización y el uso de herramientas bioinformáticas nos ha permitido seleccionar aquellas variantes intrónicas con un posible efecto sobre el mecanismo de *splicing* mediante la potencial inclusión de pseudoexones. Sin embargo, el análisis funcional mediante minigenes descartó dicho efecto indicando que las variantes seleccionadas no son causantes de enfermedad.

Finalmente, se ha investigado el efecto patogénico de las variantes c.1199+17G>A y c.1199+20G>C, identificadas en el gen *PAH* en pacientes con HFA. Ambas mutaciones provocan la exclusión del exón 11 en un sistema de minigenes e impiden la unión de U1 snRNP70 a esta región según los ensayos de unión a RNA. El análisis de los minigenes con delecciones y mutaciones puntuales en esta región, junto con la sobreexpresión de U1 snRNAs adaptados nos ha permitido identificar los motivos críticos involucrados en la regulación del correcto *splicing* del exón 11. Los resultados indicaron que la unión de U1 snRNP corriente abajo del sitio natural 5' de *splicing* determina el *splicing* eficiente del exón 11, proporcionando así una base para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a corregir mutaciones de *splicing* que afecten al exón 11 del gen *PAH* y ampliando las funciones de U1 snRNP como potenciador de *splicing* en ciertos contextos.

In this work, we have focused on the study of splicing mutations that result in hyperphenylalaninemia (HFA), by defects in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase (PTPS) that causes the deficiency of tetrahydrobiopterin (BH₄), cofactor of aromatic amino acids hydroxylases, or by defects in one of these hydroxylases, namely phenylalanine hydroxylase (PAH).

One part of the study involved the analysis of two new variants, c.164-672C>T and c.243+3A>G in the *PTS* gene, identified in an HFA patient due to a defect in PTPS. The c.164-672C>T deep intronic variant creates a potential 5' splice site and induces the inclusion of several pseudoexons between exons 2 and 3 of the *PTS* mRNA, observed in patient's fibroblasts and in minigenes. This effect could be partially reversed by antisense oligonucleotides (AONs) with different chemistry. The c.243+3A>G variant affects the natural 5' splice site of exon 4 resulting in its skipping. The overexpression of an adapted U1 snRNA perfectly complementary to the mutant 5' splice site allowed the complete recovery of the normal transcript in the minigenes system, but not in fibroblasts, so further optimization of this strategy is necessary.

In order to improve the application of antisense therapy, we have studied a new method of AON delivery, the micro-minicircles (miMCs), plasmid formed only of eukaryotic sequences. To test the efficacy of the miMCs, a parental plasmid expressing the U7 snRNA-AON fusion directed to the natural 5' splice site of exon 11 of the *PAH* gene was used in order to force the exclusion of this exon. The results obtained after the production of the miMCs and the subsequent transfection in a hepatoma cell line revealed a low efficiency in our experimental model of the miMCs as a vehicle for AON therapy, as it resulted only in partial skipping of exon 11.

In order to identify deep intronic variants that could affect splicing thus causing disease we have used massive parallel sequencing for the capture of the complete *PAH* gene in 7 HFA patients with only one mutation identified in the *PAH* gene. The interpretation of the identified intronic variants through a prioritization system and the use of bioinformatic tools has allowed to select those variants with a possible effect on the splicing mechanism through the potential inclusion of pseudoexons. However, the functional analysis using minigenes discarded this effect indicating that the selected variants are not disease-causing.

Finally, the pathogenic effect of c.1199+17G>A and c.1199+20G>C variants, identified in the *PAH* gene in HFA patients, was investigated in depth. Both mutations cause the exclusion of exon 11 in a minigene system and hinder the binding of U1 snRNP70 to this region according to RNA affinity assays. The analysis of the minigenes with deletions and point mutations in this region, together with the overexpression of adapted U1 snRNAs, led to the identification of the critical motifs involved in the regulation of the correct splicing of exon 11. The results indicate that binding of U1 snRNP downstream of the natural 5' splice site determines the efficient splicing of exon 11, thus providing a basis for the development of therapeutic strategies aimed at correcting splicing mutations that affect exon 11 of the *PAH* gene and expanding the functions of U1 snRNP as a splice enhancer in certain contexts.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades Metabólicas Hereditarias

Las enfermedades metabólicas hereditarias (EMHs), también llamadas errores innatos del metabolismo, son causadas por defectos en genes que codifican para enzimas, transportadores, factores de transcripción, etc, implicados en diferentes rutas metabólicas, y cuya deficiencia conduce a la alteración de la homeostasis celular, y consecuentemente produce un impacto sobre el fenotipo (El-Hattab 2015; Morava et al. 2015).

Las EMHs son consideradas como enfermedades raras, pues según EURORDIS (*European Organization for Rare Disease*) se considera que una enfermedad es rara cuando afecta a menos de 1 de entre 2.000 personas. Se han descrito más de 6.000 enfermedades raras y aunque la frecuencia individual es baja (1 cada 50.000 personas como media), colectivamente afectan al 6-8% de la población de la Unión Europea.

La mayoría de las EMHs son monogénicas y se heredan de manera autosómica recesiva, aunque la herencia de manera dominante, ligada al cromosoma X o la herencia mitocondrial también son posibles. Desde un punto de vista fisiopatológico, las EMHs pueden clasificarse en tres grupos: trastornos que dan lugar a intoxicación por acúmulo de metabolitos tóxicos, trastornos que afectan al metabolismo energético y trastornos que afectan a la síntesis o al catabolismo de moléculas complejas. La gran diversidad y baja frecuencia individual de las EMHs, hace que el diagnóstico, el tratamiento y el análisis bioquímico-molecular sean complejos. El desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación masiva del exoma o del genoma completo está incrementando la capacidad de diagnóstico y, en una pequeña parte de las EMHs, la detección se realiza en programas de cribado neonatal (Ezgu 2016; Pampols 2010).

Dentro de las EMHs, uno de los defectos genéticos más frecuentes implicados en el metabolismo de los aminoácidos y en el que nos hemos centrado en este trabajo son las hiperfenilalaninemias (HFAs), y en particular en defectos en la fenilalanina hidroxilasa (PAH), y en defectos en la 6-piruvoil-tetrahidropterina sintasa (PTPS).

2. Hiperfenilalaninemias

La hiperfenilalaninemia (HFA) es una condición médica caracterizada por un exceso de los niveles de fenilalanina en sangre ($>120 \mu\text{mol/L}$). Son 6 los defectos conocidos que conducen al estado de hiperfenilalaninemia: el 98% de los casos es causado por defectos en la fenilalanina hidroxilasa (PAH), causante de fenilcetonuria (PKU, MIM #261600), y el 2% restante de los casos es causado por defectos en enzimas implicadas en la síntesis o regeneración de la tetrahidrobiopterina (BH_4) (Trujillano et al. 2014), un importante cofactor implicado en la síntesis de tirosina, dopamina, serotonina, óxido nítrico y glicerol (Souza et al. 2018), o en la chaperona de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos, incluida la PAH, llamada DNAJC12 (Blau et al. 2018).

La enzima PAH se encarga de hidroxilar la fenilalanina a tirosina en una reacción dependiente del cofactor BH_4 , el cual es sintetizado a partir de la guanosina trifosfato (GTP) en tres etapas enzimáticas llevadas a cabo por GTP ciclohidrolasa I (GTPCH I), 6-piruvil-tetrahidropterina sintasa (PTPS), y sepiapterina reductasa (SR). La regeneración de dicho cofactor requiere de las enzimas pterina-4 α -carbinolamina deshidratasa (PCD), y dihidropteridina reductasa (DHPR) (Fig. 1).

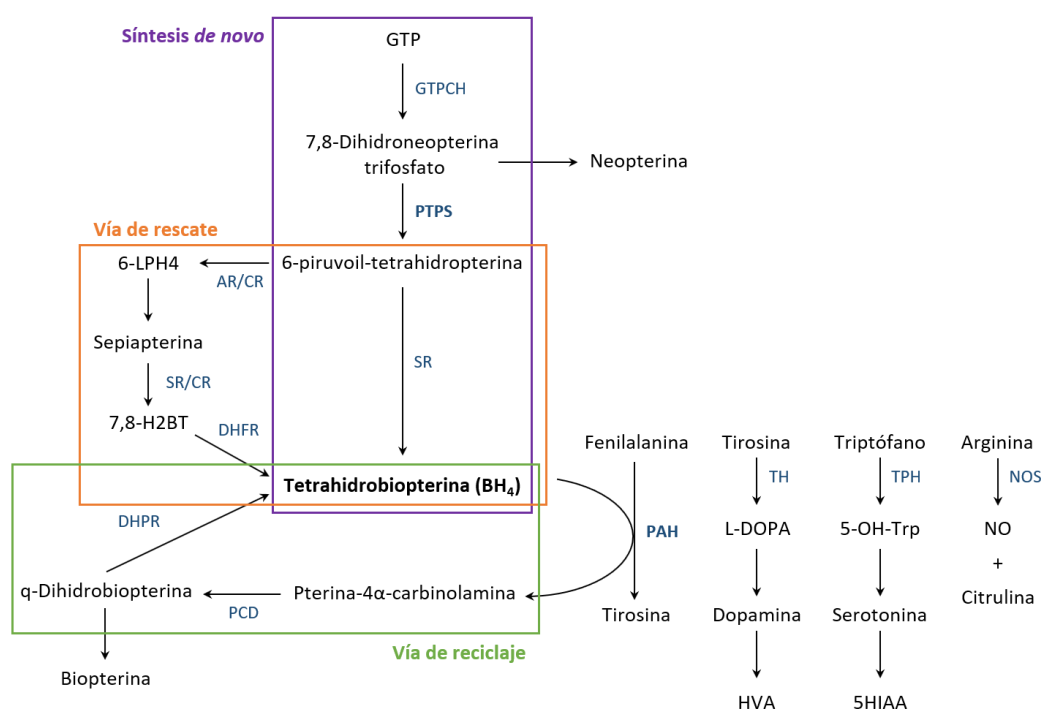


Figura 1. Síntesis y regeneración de la BH_4 , cofactor de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos y de la óxido nítrico sintasa. Los niveles de BH_4 son controlados a través de tres rutas: la vía de síntesis (recuadro morado), la vía de rescate (recuadro naranja) y la vía de reciclaje (recuadro verde). GTP indica guanosina trifosfato; GTPCH: guanosina trifosfato ciclohidrolasa I; PTPS: 6-piruvil-tetrahidropterina sintasa; AR: aldosa reductasa; CR: carbonil reductasa; SR: sepiapterina reductasa; 6-LPH4: 6-lactoil tetrahidropterina; 7,8-H2BT: 7,8-dihidrobiopterina; DHFR: dihidrofolato reductasa; DHPR: dihidropteridina reductasa; PCD: pterina-4 α -carbinolamina deshidratasa; PAH: fenilalanina hidroxilasa; TH: tirosina hidroxilasa; L-DOPA: levodopa; TPH: triptófano hidroxilasa; 5-OH-Trp: 5-hidroxitriptófano; NOS: óxido nítrico sintasa; HVA: ácido homovanílico; 5HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético.

Mutaciones en cualquiera de estas enzimas implicadas en la síntesis o regeneración de la BH₄ conduce a su deficiencia. La BH₄ es un cofactor esencial no sólo para la PAH sino también para las otras hidroxilasas de aminoácidos aromáticos (tirosina hidroxilasa y triptófano hidroxilasa), además de para la alquilgllicerol mono-oxigenasa y para las sintasas de óxido nítrico (NOS) (Fernandez-Lainez et al. 2018). Es por tanto crucial en numerosos procesos biológicos y patológicos asociados con la producción de neurotransmisores monoamina, el mantenimiento del estatus redox en el cerebro (Vasquez-Vivar et al. 2017), la respuesta inmune (Blau et al. 2001), la disfunción endotelial y cardiovascular, y la sensibilidad frente al dolor (Costigan et al. 2012). Las deficiencias en BH₄ por tanto son más severas en general que una deficiencia en PAH, y el tratamiento y la respuesta a las terapias son muy diferentes (Blau et al. 2011). Finalmente, la deficiencia en DNAJC12, miembro de la familia de la HSP40, conduce a un amplio espectro de síntomas clínicos que incluyen distonía, retraso del habla, hipertonía, parkinsonismo y características psiquiátricas (Anikster et al. 2017). Otros pacientes presentan síntomas neurológicos muy leves o incluso son asintomáticos (Blau et al. 2018).

El diagnóstico de las HFAs es posible a través de los programas de cribado neonatal que se realizan en todos los recién nacidos. Una vez identificado un caso positivo de HFA se procede a un diagnóstico bioquímico diferencial mediante la cuantificación de derivados de pterinas en orina y líquido cefalorraquídeo (LCR), así como de neurotransmisores en LCR y medida de la actividad DHPR (Blau et al. 2011; Blau et al. 2018). Para los defectos en la enzima GTPCH I, el perfil de pterinas en orina muestra bajos niveles de neopterina y biopterina; en los defectos de PTPS los niveles de neopterina están aumentados, con una disminución de los niveles de biopterina; en la deficiencia de PCD los niveles de neopterina también están aumentados, pero los niveles de biopterina están disminuidos y podemos detectar niveles de primapterina; los pacientes con deficiencia en DHPR presentan una disminución de la actividad de esta enzima en muestras de sangre en papel y un aumento de los niveles de biopterina en orina (van Wegberg et al. 2017) (**Fig. 2**). Las medidas de pterinas y neurotransmisores en LCR, así como los niveles del ácido 5-hidroxiindolacético y el ácido homovanílico en LCR (metabolitos derivados de la dopamina y serotonina, respectivamente) también resultan importantes en el diagnóstico diferencial y nos aportan información sobre la severidad de las deficiencias en BH₄ (Blau et al. 2011). En el caso de la deficiencia en DNAJC12 los niveles de pterinas en sangre, orina y LCR son normales, pero los niveles de neurotransmisores (HVA y 5HIAA) en LCR están disminuidos (Blau et al. 2018). Finalmente, el defecto se confirma mediante diagnóstico genético (Rajabi and Levy 2015), que en algunos casos puede ser utilizado como prueba de 2º nivel (Navarrete et al. 2019). El rápido diagnóstico en las primeras semanas de vida es crucial para el inicio del tratamiento y desarrollo normal del individuo (Souza et al. 2018).

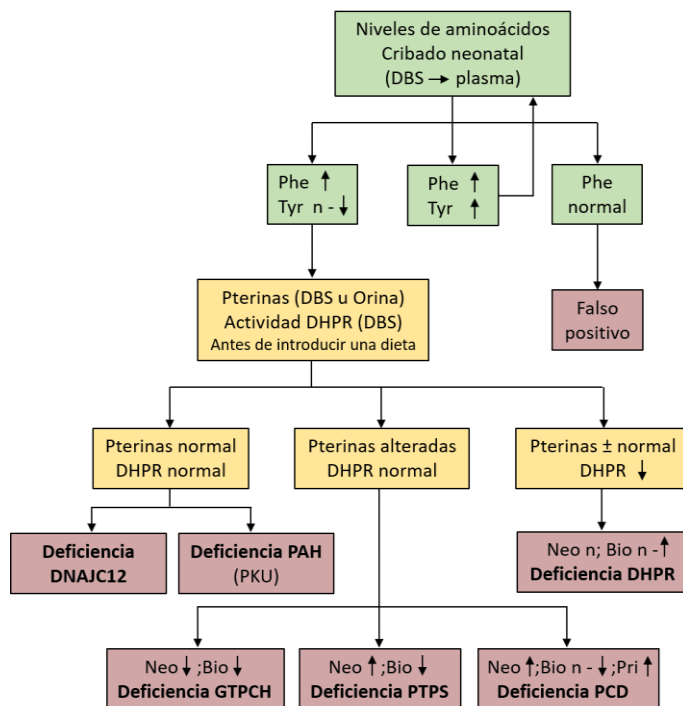


Figura 2. Protocolo de diagnóstico bioquímico de HFAs. Una vez detectados niveles elevados de fenilalanina en plasma, podemos diferenciar las formas de HFAs en función del patrón de pterinas y la actividad DHPR. DBS: muestra de sangre en papel; phe: fenilalanina; tyr: tirosina; n: normal; DHPR: dihidropteridina reductasa; PAH: fenilalanina hidroxilasa; Neo: neopterin; Bio: biopterina; Pri: primapterina; GTPCH: guanosina trifosfato ciclohidrolasa I; PTPS: 6-piruvil-tetrahidropterina sintasa; PCD: pterina-4 α -carbinolamina deshidratasa. Figura adaptada de (Blau et al. 2018).

2.1. Deficiencia en PAH: Fenilcetonuria

La deficiencia en PAH se conoce comúnmente como fenilcetonuria (PKU; MIM #261600), el error innato más frecuente en el metabolismo de los aminoácidos con más de 12.000 casos descritos (según la base de datos BIOPKU, <http://www.biopku.org/home/biopku.asp>), con un patrón de herencia autosómico recesivo (Wettstein et al. 2015). Fue descrita en 1934, cuando Asbjørn Følling identificó un exceso de ácido fenilpirúvico en la orina de dos niños, condición a la que dio el nombre de “oligofrenia fenilpirúvica”, que un año más tarde pasaría a denominarse fenilcetonuria debido a la excreción de fenilcetonas derivadas de la fenilalanina (Phe) en exceso por una reacción de transaminación (Mitchell et al. 2011; Blau 2016; Blau et al. 2001).

La prevalencia de la PKU varía ampliamente alrededor del mundo. En Estados Unidos, alrededor de 1 cada 13.000-19.000 recién nacidos tiene PKU. En Europa la prevalencia es de 1 cada 10.000 recién nacidos, aunque en ciertas áreas con una alta consanguinidad entre la población, la prevalencia es mucho más alta, como es el caso de Turquía donde afecta a 1 cada 2.600 e Irlanda del Norte con 1 cada 4.500 nacidos. Otras zonas con una alta prevalencia son Israel y Escocia con 1 cada 5.000, la población Árabe con 1 cada 6.000 y Checoslovaquia con 1 cada 7.000 nacimientos. Sin embargo, se describen incidencias más bajas en América Latina (1 cada 25.000-50.000 nacidos), y Finlandia, Japón y África con aproximadamente 1 cada 100.000 nacimientos (Blau et al. 2010; Blau et al. 2014).

La PAH cataliza la conversión de Phe a tirosina (Tyr), en una reacción dependiente del cofactor BH_4 y de los co-sustratos O_2 y Fe^{2+} . Adicionalmente, como se ha mencionado, hay componentes acoplados a este sistema que permiten el normal funcionamiento de la vía mediante la regeneración del BH_4 , como son la PCD y la DHPR (**Fig. 1**).

La PAH es una proteína citosólica que se expresa principalmente en hígado, y en algunos organismos también en el riñón constituyendo un 30% de la actividad PAH detectable en hígado (Blau et al. 2014). Está codificada por el gen *PAH* (MIM #612349) localizado en el cromosoma 12 (12q22-12q24.2), que comprende 13 exones y 12 intrones, abarcando un total de 100 kb (van Spronsen et al. 2017). El análisis de la base de datos BIOPKU revela más de 1.000 variantes descritas, de las cuales el 65% se corresponde con mutaciones *missense* y *nonsense*, seguido de un 13% de variantes que afectan al *splicing* y un 11% que son pequeñas delecciones (Blau 2016).

Esta enzima pertenece a una clase de monooxigenasas, miembro de las hidroxilasas de aminoácidos dependientes de BH_4 . Está formada por subunidades idénticas que se ensamblan para formar predominantemente tetrámeros, pudiéndose encontrar también como dímero, formas que existen en un equilibrio dependiente de pH. Ambas formas son catalíticamente activas, tienen diferente cinética y están reguladas bajo diferentes condiciones (Jaffe 2017). Cada subunidad de 50KDa consiste en tres dominios: un dominio regulador N-terminal que confiere flexibilidad estructural y facilita la naturaleza reguladora del dominio, un dominio catalítico que contiene el sitio activo de la enzima, y el dominio C-terminal responsable de la oligomerización de los monómeros de la PAH (Fusetti et al. 1998; Kobe et al. 1999). La PAH es altamente sensible a los cambios en las concentraciones de sustrato, y su actividad está estrechamente regulada por la activación del sustrato, la fosforilación reversible y la inhibición del cofactor, mecanismos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis de la Phe *in vivo* (Blau et al. 2018).

2.1.1. Diagnóstico y clasificación

La PKU fue la primera enfermedad metabólica asociada a un retraso mental (Blau et al. 2014) y una de las primeras en ser incluida dentro de los programas de cribado neonatal en el mundo. La detección de la enfermedad en los primeros días de vida es fundamental para el rápido inicio del tratamiento mediante una restricción dietética de Phe y así prevenir los daños neurológicos severos en los pacientes (Blau et al. 2011). Actualmente en los países desarrollados la PKU es identificada a través de los programas de cribado neonatal mediante la detección por espectrometría de masas de los niveles de Phe en muestras de sangre en papel. Todos los neonatos con niveles altos de Phe deben ser sometidos a un diagnóstico diferencial bioquímico (Thony and Blau 2006; Blau et al. 2011) (**Fig. 2**) y genético (Navarrete et al. 2019), como se describe en el apartado anterior, para

determinar el defecto. Este estudio permite diferenciar entre las deficiencias en PAH y el resto de los defectos que causan HFA.

La tolerancia a la ingesta de Phe en la dieta y los niveles de Phe en sangre han sido durante muchos años y en muchos casos aún son las bases para la clasificación bioquímica de los defectos en el gen PAH (Blau et al. 2011) (Tabla 1). Sin embargo, hoy en día los niveles de Phe no ayudan a diagnosticar a los pacientes ya que éstos comenzarán el tratamiento antes de alcanzar sus concentraciones máximas; al igual que la tolerancia exacta a la Phe es difícil de determinar debido a condiciones no estandarizadas y discrepancias entre la ingesta prescrita y la real. Es por ello que, en la actualidad, la clasificación de los pacientes con deficiencia en PAH se basa en los que no requieren tratamiento y en los que necesitan tratamiento (dieta restrictiva y/o BH₄) (van Wegberg et al. 2017).

Tabla 1. Clasificación estándar de los defectos en PAH según los niveles de Phe en sangre y la tolerancia a la ingesta de Phe en la dieta.

Fenotipo	Phe en sangre (μmol/L) *	Tolerancia a la Phe (mg/kg/día)
HFA benigna (MHP, <i>mild</i> HFA)	<600	>50
PKU suave (<i>mild</i> PKU)	600-1.200	20-50
PKU clásica (<i>classic</i> PKU)	>1.200	<20

* Valores normales: 50-120 μmol/L

2.1.2. Presentación clínica

Los defectos en la PAH conllevan altas concentraciones de Phe en sangre, que atraviesa la barrera hematoencefálica causando alteraciones en el desarrollo y función del cerebro (van Spronsen et al. 2017). Los pacientes PKU que no han sido tratados presentan una sintomatología muy variada caracterizada principalmente por problemas de comportamiento (agresividad, hiperactividad, ansiedad, aislamiento social), y alteraciones neurológicas (retraso mental, disminución del crecimiento, microcefalia, epilepsia, movimientos involuntarios de las extremidades, temblores, etc) (Mitchell et al. 2011; Walter et al. 2012). Esto está relacionado con una formación defectuosa de la mielina y con la producción alterada de dopamina, norepinefrina y serotonina en el sistema nervioso central (SNC). Además, los altos niveles de Phe también son responsables de la inhibición del transporte de aminoácidos neutros largos (LNAA) que atraviesan la barrera hematoencefálica disminuyendo la síntesis de neurotransmisores y proteínas en el SNC (Blau et al. 2014). El defecto en PAH también es responsable de la pérdida de pigmentación de la piel y el cabello, por un déficit en la producción de tirosina, precursor de la melanina, así como del mal olor de la orina por acumulación de fenilcetonas.

Cuando el diagnóstico se realiza en el cribado neonatal y el tratamiento se inicia de forma inmediata, los pacientes muestran un desarrollo normal pudiendo presentar secuelas neurocognitivas leves (dificultades en la planificación y organización, en la capacidad de memorizar) y tener algún problema social o de comportamiento, dependiendo fundamentalmente de la adherencia al tratamiento dietético (Mitchell et al. 2011).

2.1.3. Tratamiento y terapias en investigación

- **Restricción dietética de Phe**

El principal tratamiento de la PKU, descrito por Bickel en 1953, es la restricción de la fenilalanina en la dieta. Esto evita la acumulación de dicho aminoácido en sangre, orina y tejidos (Blau 2016). Generalmente, las dietas suelen contener cantidades inadecuadas de micronutrientes derivados de productos animales y carecen de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Por ello, la restricción proteica debe combinarse con la administración de una fórmula especial sin fenilalanina, que contiene todos los demás aminoácidos esenciales, especialmente tirosina (aminoácido precursor de neurotransmisores), además de vitaminas, minerales, etc (Strisciuglio and Concolino 2014). La dieta restrictiva en fenilalanina debe mantenerse durante toda la vida y ser monitorizada con frecuencia por medición de los niveles de Phe en plasma/sangre (van Wegberg et al. 2017).

- **Tratamiento con BH₄**

Ensayos clínicos en grupos de pacientes con defectos en el gen *PAH*, demostraron que la administración de la forma sintética de BH₄ (dicloruro de sapropterina o *Kuvan*, nombre comercial actual) resulta en una disminución de los niveles de Phe (al menos del 30%) y en un aumento significativo de la tolerancia a la Phe en la dieta (Kure et al. 1999). Se ha observado que la BH₄ actúa principalmente como chaperona promoviendo la estabilización de la enzima PAH y su correcto plegamiento, evitando su degradación por el proteasoma (Blau et al. 2018). Sin embargo, no todos los pacientes PKU responden favorablemente al tratamiento con BH₄, dependiendo del tipo de mutación, y muy pocos pueden eliminar la restricción proteica (Longo et al. 2018). Se estima que 1 de cada 5 pacientes PKU responde al tratamiento, siendo más efectivo en aquellos con un fenotipo menos severo, correspondiendo a genotipos con variantes *missense* que resultan en defectos de plegamiento y que retienen cierta actividad residual (Blau et al. 2010).

El uso de BH₄ como chaperona farmacológica abrió las puertas a la búsqueda de nuevas chaperonas como tratamiento para la PKU (Pey et al. 2008; Underhaug et al. 2012). Se han identificado y probado diferentes compuestos farmacológicos en un modelo de ratón PKU; uno

de ellos, la bencil hidantoina, mostró una reducción de los niveles de Phe dos veces más eficaz que el tratamiento con BH₄ (Santos-Sierra et al. 2012).

- **Terapia con aminoácidos neutros largos (LNAA)**

Los suplementos de LNAAs en la dieta se basan en la competencia con la Phe por el mismo transportador en el tracto gastrointestinal y en la barrera hematoencefálica (Matalon et al. 2006). La suplementación con LNAAs reduce los niveles de Phe en plasma y en cerebro, lo que mejora el funcionamiento neuropsicológico (el lenguaje verbal y la flexibilidad cognitiva) (Schindeler et al. 2007). Actualmente se ha desarrollado un nuevo suplemento alimenticio, PheLNAA, con concentraciones más altas de LNAAs. Además, también contiene más vitaminas y otros aditivos nutricionales que pueden ser deficientes en la dieta PKU, como luteína (un antioxidante importante para el desarrollo del cerebro), biotina, vitamina B₁₂ y ácido fólico. El uso de esta nueva fórmula resultó en una mayor disminución de los niveles de Phe en sangre en comparación con el uso de fórmulas anteriores (Concolino et al. 2017). Sin embargo, no hay evidencias suficientes para el uso rutinario de LNAAs en pacientes PKU y no deben ser administrados en pacientes menores de 12 años, ni durante el embarazo (van Wegberg et al. 2017).

- **Terapia de reemplazo enzimática**

La enzima recombinante fenilalanina amonio liasa (PAL) unida covalentemente al grupo polietilenglicol (PEG), también llamada pegvaliasa (PEG-PAL), convierte la Phe en amonio (metabolizado en el hígado) y en ácido trans-cinámico (excretado en la orina). La unión del grupo PEG a la enzima PAL está asociada con una reducción de la respuesta inmune y una mejora de la estabilidad farmacodinámica. Ensayos clínicos en humanos en fase 1 demostraron una reducción de los niveles de Phe con una única dosis de PEG-PAL (Longo et al. 2014). Recientemente, estudios clínicos en fase 2 y 3 resultaron en reducciones significativas y persistentes en la concentración de Phe plasmática, lo que respalda la eficacia de PEG-PAL en el tratamiento de pacientes adultos con PKU, para lo que ha sido finalmente aprobada por la FDA (Thomas et al. 2018; Longo et al. 2018). Adicionalmente, se ha desarrollado y probado en modelos murinos un sistema de administración innovador y eficaz para la terapia de sustitución enzimática, que utiliza eritrocitos como vehículo, con las ventajas de un control bioquímico más estable, una posible reducción de la frecuencia de tratamiento, y un menor coste de este, ya que la membrana de los eritrocitos protege la enzima de la inactivación inmunológica y no es necesaria la proteína unida al grupo PEG (Pascucci et al. 2018).

- **Terapia y edición génica**

El uso en los modelos de ratón PKU de virus adenoasociados recombinantes con el cDNA PAH, dirigidos al hígado con una sola inyección intravenosa (Ding et al. 2006), o al musculo mediante inyección intramuscular (Rebuffat et al. 2010) ha mostrado su eficiencia para disminuir los niveles de Phe en sangre. Posteriormente, el uso de minicírculos (MC), vectores plasmídicos sin secuencias bacterianas, permitió normalizar los niveles de Phe en sangre y revertir la hipopigmentación durante 1 año mediante una única inyección hidrodinámica en la vena de la cola de ratones PKU (Viecelli et al. 2014). Recientemente, el uso en ratones mediante una inyección intravenosa de vectores adenoasociados para la edición del genoma basada en el sistema CRISPR-Cas9, resultó en una reversión de los niveles fisiológicos de Phe en sangre; además de observar tasas de corrección en el mRNA de hasta un 63%, una restauración de la actividad de la enzima PAH y la reversión de la hipopigmentación (Villiger et al. 2018).

2.2. Defectos en BH₄

El control metabólico de los niveles de BH₄ está controlado por tres vías principales: la vía por la cual se produce la síntesis *de novo*, la vía de rescate y la vía de reciclaje (**Fig. 1**). La primera reacción en la ruta de biosíntesis de BH₄ es la conversión de GTP a 7,8-dihidroneopterina trifosfato (NH₂TP) la cual es catalizada por GTPCH. La segunda etapa esta catalizada por PTPS, que transforma el NH₂TP en 6-piruvil-tetrahydropterina (6-PTP), en una reacción dependiente de Zn²⁺, Mg²⁺ y NADPH. Finalmente, el 6-PTP es convertido a BH₄ por la SR (Thony et al. 2000; Longo 2009). Sin embargo, ante una deficiencia en SR, la síntesis de BH₄ a partir de 6-PTP es llevada a cabo por las enzimas aldosa reductasa (AR), carbonilo reductasa (CR) y dihidrofolato reductasa (DHFR) a través de la vía de rescate. La actividad DHFR puede producir suficiente cantidad de BH₄ en el hígado y otros tejidos periféricos, pero no en el SNC, pues la enzima DHFR se expresa en muy baja proporción en el cerebro (Costigan et al. 2012). En la ruta de reciclaje el BH₄ es oxidado a pterina-4 α -carbinolamina y posteriormente regenerado por PCD y DHPR (**Fig. 1**).

2.2.1. Deficiencia en PTPS

La deficiencia en PTPS (MIM #261640) es una enfermedad autosómica recesiva, una de las formas más frecuentes (63,3%) dentro de las deficiencias en BH₄ asociada a HFA (Fernandez-Lainez et al. 2018), con más de 700 casos descritos según la base de datos BIODF (<http://www.biopku.org/home/biodef.asp>). La prevalencia a nivel mundial es de 1 cada 1.000.000 de recién nacidos (Souza et al. 2018), aunque existen áreas donde la incidencia es mayor como Taiwan donde afecta a 1 cada 100.000 (Niu 2011).

La enzima PTPS se expresa de forma constitutiva en varios tejidos y tipos celulares con una localización principalmente citosólica (Thony et al. 2000). Está codificada por el gen *PTS* (MIM #612719), localizado en el cromosoma 11 (11q22.3), que engloba 6 exones. Hasta la fecha se han descrito alrededor de 110 variantes responsables de la deficiencia de PTPS, siendo principalmente cambios *missense* y *nonsense* (76%) (Fernandez-Lainez et al. 2018). El mRNA codifica una proteína de 145 aminoácidos, con un peso molecular de 16,4 KDa.

La enzima es un homohexámero formado por la asociación de dos trímeros, asociados cabeza con cabeza por interacciones electrostáticas para formar una estructura de barril- β con 12 cadenas β -antiparalelas rodeadas por un anillo de α -hélices, que encierra un núcleo hidrófilo (Oppliger et al. 1995; Burgisser et al. 1995). Cada monómero contiene un sitio activo que alberga cuatro residuos de histidina (24, 49, 51 y 90), uno de cisteína (43) y uno de ácido glutámico (134), coordinando cada uno de los monómeros un átomo de zinc (Fernandez-Lainez et al. 2018). Este sitio activo con función aún desconocida podría ser usado como canal para los intermediarios inestables de las pterinas (NH₂TP y 6-PTP), formando algún tipo de complejo entre las enzimas y sus sustratos.

2.2.1.1. Diagnóstico y clasificación

Como se ha mencionado anteriormente el diagnóstico se basa en una primera medida de los niveles de Phe y Tyr en plasma mediante los programas de cribado neonatal, y posteriormente se procede al diagnóstico diferencial por cuantificación de los niveles de pterinas en orina y LCR (**Fig 2**). Las deficiencias en PTPS, según las características bioquímicas, se clasifican en periféricas (o suaves) y en severas. Los niveles de Phe en sangre para la forma periférica oscilan en un rango de 151 a 1.053 $\mu\text{mol/L}$ y de 342-2.120 $\mu\text{mol/L}$ en la forma severa (valores normales <120 $\mu\text{mol/L}$) (Leuzzi et al. 2010). En cuanto a los niveles de pterinas, en la forma severa los niveles de neopterina, tanto en orina como en LCR, son más elevados que en la forma periférica; sin embargo, los niveles de biopterina están ligeramente más disminuidos. La diferencia más significativa entre las dos formas radica en los niveles de neurotransmisores en LCR, detectables y normales en la forma periférica y casi ausentes en la forma severa (Blau et al. 2001).

2.2.1.2. Presentación clínica

En algunos casos los síntomas se empiezan a notar incluso durante el periodo de gestación observándose una restricción del crecimiento, una disminución de los movimientos fetales como consecuencia del déficit de BH₄ en el metabolismo, así como daño cerebral debido a la deficiencia de neurotransmisores (Fernandez-Lainez et al. 2018).

Tras el nacimiento, los neonatos afectados son pequeños para la edad de gestación, prematuros, con bajo peso al nacer y con microcefalias (Vasquez-Vivar et al. 2017). La mayoría de los niños presentan síntomas neurológicos como retraso en el desarrollo, hipotonía muscular, espasticidad y convulsiones entre otros síntomas (Souza et al. 2018). Además de estas manifestaciones neurológicas, también se pueden apreciar la presencia de manifestaciones como olor extraño, cabello rubio, frecuente neumonía y trastornos del control de la temperatura (Blau et al. 2001). Sin embargo, aquellos pacientes que han sido diagnosticados en el cribado neonatal o prenatal y se les ha implementado rápidamente el tratamiento, no suelen presentar una manifestación neurológica tan severa.

2.2.1.3. Tratamiento

El tratamiento debe dirigirse a normalizar los niveles séricos de Phe y de neurotransmisores cerebrales administrando BH₄ (dicloruro de sapropterina en su forma sintética o *Kuvan*) y los precursores de neurotransmisores levodopa (L-DOPA) y 5-hidroxitriptofano (5-HTP), dado que la BH₄ no atraviesa la barrera hematoencefálica (Vasquez-Vivar et al. 2017). Dependiendo del fenotipo el tratamiento puede variar; en la forma periférica el tratamiento consiste únicamente en la administración de BH₄ (Leuzzi et al. 2010). El uso de L-DOPA puede producir irritabilidad y discinesia severa, y el uso de 5-HTP puede resultar en la aparición de náuseas, vómitos, diarrea o dolor abdominal, por lo que los niveles de ambos deben ajustarse cuidadosamente a cada paciente incrementándolos poco a poco hasta llegar a la dosis recomendada.

3. Mecanismo de *splicing*

La eliminación de los intrones en los genes eucariotas es un proceso complejo denominado *splicing*, cuya regulación requiere de elementos en *cis* incluidos en el mRNA y factores en *trans* que se unen a dichos elementos (Montes et al. 2019).

El *splicing* del pre-mRNA está mediado por una compleja ribonucleoproteína macromolecular llamada espliceosoma, que funciona en un ciclo complejo y dinámico de ensamblaje, reacción y desensamblaje, en el que cinco ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP: U1, U2, U4, U5, U6) y más de 200 proteínas se reconocen y ensamblan de manera precisa y secuencial para la eliminación de cada intrón (Lee and Rio 2015; Dagueuet et al. 2015). El espliceosoma identifica los intrones diana por reconocimiento de los elementos en *cis* que constituyen las secuencias consenso conservadas: el sitio 5' donador y 3' aceptor de *splicing*, junto con el sitio de ramificación y el tracto polipirimidínico (Manning and Cooper 2017) (**Fig. 3A**). En la primera etapa de ensamblaje del espliceosoma U1 snRNP reconoce y se une al sitio 5' de *splicing* formando el complejo E, mientras que U2 reconoce el sitio 3' de *splicing* y se une firmemente al sitio de ramificación para formar el complejo A. A esto le sigue el reclutamiento de U4, U5 y U6 para generar el complejo B, que tras varias reorganizaciones conformacionales cataliza la primera reacción de trans-esterificación. Este proceso genera un complejo C que da como resultado la unión de los exones en una segunda reacción de trans-esterificación y la liberación del intrón y de las proteínas snRNPs para su posterior reciclaje (Yan C 2019; Montes et al. 2019) (**Fig. 3B**).

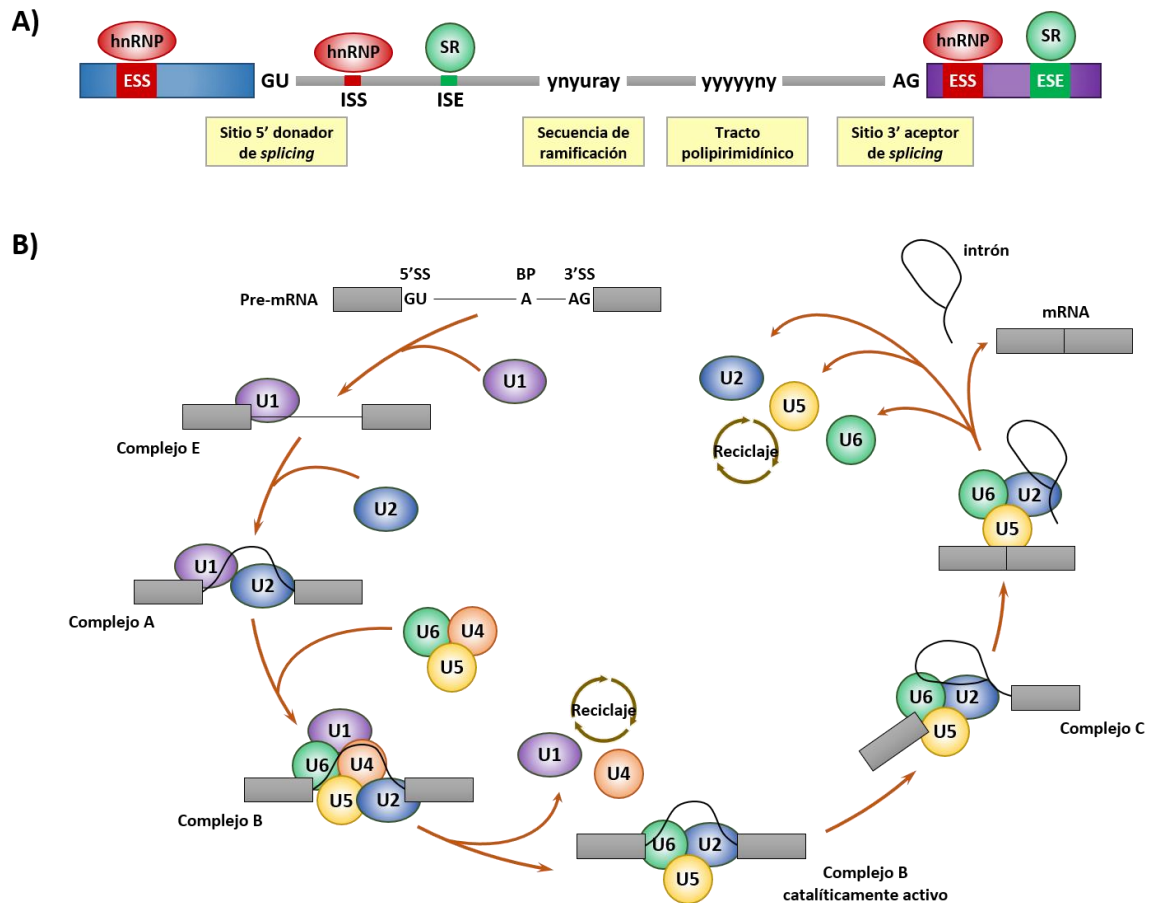


Figura 3. Proceso de *splicing* a través del ciclo de ensamblaje y desensamblaje del espliceosoma. A) Representación esquemática del pre-mRNA; dos exones (cajas azul y morada) separados por un intrón que contiene los cuatro elementos *cis* necesarios para el reclutamiento de la maquinaria de *splicing*: el sitio 5' de *splicing*, la secuencia de ramificación, el tracto polipirimidínico y el sitio 3' de *splicing*. Además, en los exones y en el intrón podemos observar las secuencias reguladoras potenciadoras (ESE o ISE) o silenciadoras del *splicing* (ESS o ISS) a las cuales se unen las proteínas ricas en serina y arginina (SR), y las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP), respectivamente. B) Esquema representativo del proceso de *splicing*. Reconocimiento inicial del sitio 5' de *splicing* por U1 snRNP (Complejo E) y del sitio 3' de *splicing* por U2 snRNP (Complejo A), seguido de la unión de U4, U5 y U6 para formar el Complejo B. Este complejo pasa a ser catalíticamente activo tras una serie de cambios conformacionales y el desplazamiento de U1 y U4, que conduce a la generación de un lazo para formar el Complejo C. Finalmente, se produce la unión de los exones, la liberación y degradación del intrón y el reciclaje de las proteínas snRNPs. Figura adaptada de (Lee and Rio 2015; Montes et al. 2019).

Adicionalmente, hay otras secuencias menos conservadas que se localizan tanto en los exones como en los intrones, pudiendo potenciar el reconocimiento del exón (*exonic splicing enhancers*, ESE o *intronic splicing enhancers*, ISE) o inhibiendo el mismo (*exonic splicing silencers*, ESS o *intronic splicing silencers*, ISS) (Fig. 3A). Estas secuencias son reconocidas por los factores en *trans* que incluyen principalmente las proteínas ricas en serina y arginina (SR), y la familia de las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) que favorecen o dificultan, respectivamente, el reclutamiento de la maquinaria de *splicing* para el correcto reconocimiento de los exones (Bergsma AJ 2017; Daguenet et al. 2015).

3.1. Alteraciones en el mecanismo de *splicing*

Las alteraciones en el proceso de *splicing* representan una de las principales causas de enfermedad humana. Aproximadamente, el 15-50% de todas las mutaciones causantes de enfermedad afectan o pueden afectar al proceso de *splicing* (HGMD *professional release* 2018.4) (Baralle and Buratti 2017), como consecuencia de mutaciones localizadas tanto en las secuencias conservadas presentes en el pre-mRNA (sitio 5' y 3' de *splicing*), como dentro de los elementos reguladores conservados (ESE, ESS, ISE, ISS), o bien localizadas en otros componentes del espliceosoma (Baralle and Giudice 2017).

Muchas de las mutaciones que alteran el patrón de *splicing* interfieren en la definición del exón, afectando a los sitios 5' y 3' de *splicing* o a las secuencias silenciadoras (ESS o ESI) o potenciadoras (ESE o ISE), lo que resulta en la exclusión del exón (*exon skipping*), en la activación de sitios crípticos de *splicing* o en algunos casos en la retención de parte del intrón. Adicionalmente, hay mutaciones que pueden activar o crear nuevos sitios de *splicing* que resultan en la inclusión de secuencias intrónicas en el mRNA, llamadas pseudoexones (Scotti and Swanson 2016; Vaz-Drago et al. 2017) (**Fig. 4A**). La mayoría de los pseudoexones derivan de secuencias altamente repetidas que se distribuyen de forma dispersa a lo largo del genoma humano. Estas secuencias cortas (SINE, *short interspersed nuclear elements*) o largas (LINE, *long interspersed nuclear elements*), suelen estar flanqueadas por sitios potenciales 5' y 3' de *splicing*, que en situación normal no son incluidas en el mRNA o lo son en muy baja proporción, y representan el 46% del DNA humano (Richardson et al. 2015). La clase más abundante son las secuencias repetidas de tipo *Alu* con un 11% de representación en el genoma. Los elementos *Alu*, con una longitud de aproximadamente 300 pb, tienen una estructura dimérica formada por dos monómeros idénticos separados por una secuencia rica en adenosina que sirve como tracto polipirimidínico al sitio 3' críptico de *splicing* (Sorek 2007; Vorechovsky 2010).

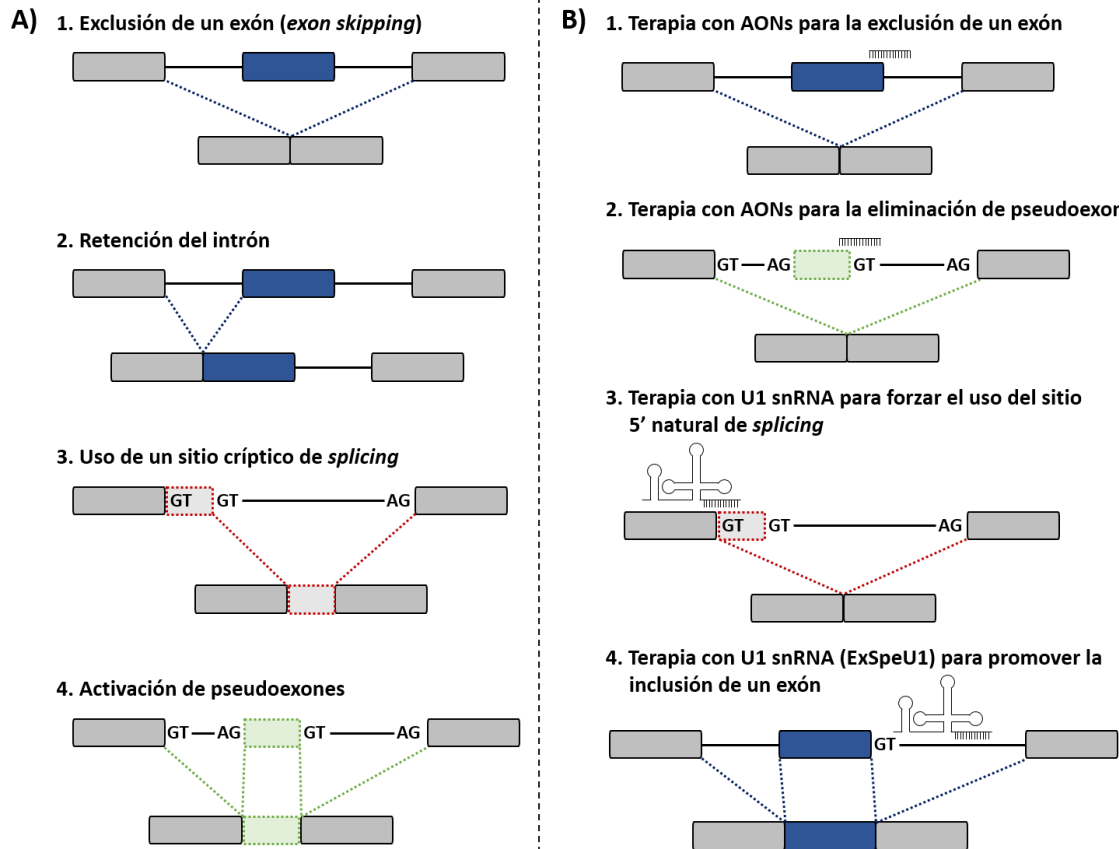


Figura 4. Alteraciones en el patrón de *splicing* y estrategias terapéuticas. Las secuencias de exones e intrones se muestran con cajas y líneas, respectivamente. **A)** Representación esquemática del efecto producido por las distintas mutaciones que afectan al proceso de *splicing*. Mutaciones que interfieren en la definición del exón por su localización en las secuencias conservadas, o que alteran sitios de unión a elementos potenciadores del *splicing* pueden resultar en la exclusión de un exón (1) o en la retención de un intrón (2). Mutaciones que activan sitios crípticos de *splicing* inducen la inclusión de una región intrónica adyacente a un exón (3) o una región intrónica interna, llamada pseudoexón (4). **B)** Principales terapias para la modulación del *splicing* basadas en el uso de AONs y U1 snRNAs modificados. Los AONs pueden dirigirse a los sitios de *splicing* canónicos o a elementos potenciadores del *splicing* con el fin de promover la exclusión de un exón y recuperar la pauta de lectura (1), o a sitios crípticos de *splicing* para inducir la eliminación de pseudoexones (2). La terapia con U1 snRNAs va dirigida a corregir los defectos de *splicing* de las mutaciones que afectan al sitio 5' natural de *splicing*, bien forzando su unión al mismo (3), o bien por su unión a regiones intrónicas no conservadas (4).

Todos los cambios que afectan al proceso de *splicing* pueden producir pérdida de función por la generación de una proteína truncada o con secuencia alterada, y frecuentemente la introducción de un codón de parada prematuro resulta en la degradación del mRNA por el mecanismo NMD (*Nonsense Mediated Decay*) (Singh and Cooper 2012).

En la mayoría de los casos la detección de las mutaciones de *splicing* causantes de enfermedad se realizaba por secuenciación convencional por el método de Sanger, que se centraba en analizar las regiones codificantes (exones) y sus regiones intrónicas flanqueantes. Hoy en día, con la implementación de la secuenciación masiva (NGS, *Next Generation Sequencing*), que permite la captura de genes completos, se han podido identificar mutaciones intrónicas internas, muy lejos

de los exones, incluso varias kb (Hodges et al. 2007; Rizzo and Buck 2012). Este tipo de cambios pueden activar o crear nuevos sitios de *splicing* que son utilizados junto con sitios crípticos adyacentes para la activación de pseudoexones (Vaz-Draco et al. 2017). Actualmente, la secuenciación de transcriptomas (*RNA-seq*) ha supuesto un gran avance como estrategia para la identificación de posibles mutaciones que afectan al *splicing* tanto en las regiones exónicas como en las regiones intrónicas profundas (Kremer et al. 2017; Cummings et al. 2017).

El reconocimiento de los defectos de *splicing* asociados a determinadas mutaciones puede llevarse a cabo mediante un análisis *in silico* con el uso de herramientas bioinformáticas como primera aproximación, permitiendo predecir la fortaleza, creación o ruptura de los sitios 5' y 3' de *splicing*, así como los potenciales sitios de unión de los factores de *splicing* (Bergsma AJ 2017). Sin embargo, las predicciones no siempre son correctas, siendo necesarios estudios transcriptómicos si se dispone de muestras de tejidos donde se expresa el gen, lo cual no siempre es posible, o bien análisis funcionales, *in vitro* o *ex vivo* en modelos celulares con minigenes. Los minigenes son plásmidos que incluyen el exón afectado por la mutación de *splicing* y una porción de sus regiones intrónicas flanqueantes. El análisis transcripcional de la expresión transitoria de la construcción normal y mutante permite determinar cuál es el efecto sobre el proceso de *splicing* de la mutación analizada (Desviat et al. 2012; Baralle and Buratti 2017).

3.2. Estrategias terapéuticas para la modulación del *splicing*

Una vez identificadas las mutaciones que afectan al proceso de *splicing* y elucidado el mecanismo patogénico, en los últimos años se están desarrollando terapias dirigidas a la corrección o reversión de esos defectos. Las principales terapias en la modulación del *splicing* se basan en el uso de oligonucleótidos antisentido (AONs) dirigidos a potenciadores o secuencias consenso de *splicing* para la exclusión del exón de interés o dirigidos a sitios silenciadores de *splicing* para promover la inclusión del exón diana (Crooke et al. 2018), y en el uso de U1 snRNAs adaptados que mejoran el reconocimiento del sitio 5' natural de *splicing* mutado (Tajnik et al. 2016) (Fig. 4B).

3.2.1. Oligonucleótidos antisentido

En los últimos años el uso de la terapia con AONs ha experimentado grandes avances; desde la primera demostración para bloquear un sitio 5' críptico de *splicing* usado frente al sitio natural en el gen β -globina causante de β -talasemia (Dominski and Kole 1993), hasta alcanzar en numerosos casos la fase de ensayos clínicos, e incluso su aprobación y comercialización como fármacos (Crooke et al. 2018). Los AONs son pequeñas moléculas de ácidos nucleicos sintéticos fácilmente degradables por endo- y exonucleasas, por ello, son modificados químicamente para

prevenir su degradación. Entre ellos están los SSOs (*splice-switching antisense oligonucleotides*) modificados en su totalidad para evitar además el reclutamiento de la RNasa H y poder actuar como moduladores del *splicing*. Este tipo de oligonucleótidos interaccionan por complementariedad de bases con el RNA bloqueando estéricamente el acceso de la maquinaria de *splicing* al pre-mRNA (Rigo et al. 2014). Las modificaciones químicas mejoran la afinidad de unión, la estabilidad y las propiedades farmacodinámicas. El tipo de esqueleto y el azúcar del oligonucleótido son las principales modificaciones que contribuyen también a la eficiencia del transporte al interior de las células, la biodistribución, la toxicidad y el uso terapéutico en humanos (Sharma and Watts 2015; Evers et al. 2015). Los SSOs más utilizados presentan un esqueleto de tipo fosforotioato (PS) cargado negativamente que les confiere gran estabilidad, y modificaciones en la posición 2' del azúcar que les hace resistentes a la acción de la RNasa H; dentro de esta categoría encontramos los 2'-O-metil (2'-OMe) y 2'-O-metoxietil (2'-MOE) con un grupo metil o metoxietilo en la posición 2' de la ribosa, respectivamente, y los LNA (*Locked Nucleic Acid*) con un anillo de furanosa como azúcar. Los LNA tiene una alta afinidad por su diana lo que a veces resulta en la unión a dianas inespecíficas (Campbell and Wengel 2011), y además se ha observado que su administración en modelos murinos induce un alto riesgo de hepatotoxicidad (Swayze et al. 2007). Otro tipo de SSO posee un esqueleto de tipo fosforodiamidato (de carga neutra) y como azúcar un anillo morfolino (PMO). Los PMO exhiben una alta resistencia a nucleasas, proteasas, esterasas y una amplia variedad de enzimas presentes en los fluidos biológicos, aunque son rápidamente eliminados de la sangre por lo que se requieren dosis elevadas para obtener una respuesta farmacológica y agentes que faciliten su entrada por endocitosis a las células. Para mejorar su eficacia *in vivo* se desarrollaron los vivo-morfolino (VPMO) unidos a un dendrímero de octaguanidina rico en argininas, destinado a mejorar la permeabilidad celular y, por tanto, facilitar su captación y liberación endosomal (Evers et al. 2015; Nan and Zhang 2018). Desafortunadamente, la administración intravenosa de VPMO en ratones ha mostrado una alta toxicidad (Gallego-Villar et al. 2014; Ferguson DP 2014).

Los SSOs han sido diseñados para corregir defectos producidos por mutaciones de *splicing*, alterar las isoformas de *splicing* hacia las terapéuticamente favorables, eliminar exones portadores de mutaciones como es el caso de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) mediante el bloqueo de un sitio natural de *splicing* o un sitio potenciador, favorecer la inclusión de exones (estrategia usada en atrofia muscular espinal, SMA, bloqueando un sitio silenciador del *splicing*), restablecer la fase de lectura en caso de deleciones (como en DMD) o por la creación de un codón de parada prematuro (Havens and Hastings 2016), o para prevenir la inclusión aberrante de pseudoexones (Dhir and Buratti 2010; Vaz-Drago et al. 2017). Recientemente, los SSOs han mostrado resultados

prometedores en ensayos clínicos para el tratamiento de DMD y SMA, con dos SSOs aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso clínico en estas patologías (Aartsma-Rus and Krieg 2017; Ottesen 2017), indicando su posible aplicabilidad a otros defectos de *splicing* causantes de enfermedad.

3.2.1.1. Los minicírculos como vehículo para los AONs

Los AONs son quizá la estrategia más prometedora para la modulación del *splicing*; sin embargo, presentan varias desventajas que incluyen una captación celular limitada, baja eficacia y especificidad para la administración dirigida, y una rápida eliminación de la circulación después de inyecciones intravenosas. Estas características impulsan la necesidad de administraciones repetidas para lograr una respuesta terapéutica, con la consecuencia negativa de su acumulación en los tejidos y su potencial toxicidad. Para lograr un efecto terapéutico de larga duración sin inyecciones repetidas, se requiere un sistema vectorizado. De hecho, es posible modificar pequeños RNA nucleares (snRNA) con secuencias antisentido específicas e introducirlos en vectores virales para obtener una corrección a largo plazo (Imbert et al. 2017; Godfrey et al. 2017). Las snRNPs están involucradas en el procesamiento del pre-mRNA y pueden dividirse en dos clases, los que incluyen las proteínas Sm (comprende a U1, U2, U4, U4atac, U5, U7, U11, U12) y los que incluyen proteínas de clase Lsm (U6 y U6atac), en ambos casos se agrupan para formar una estructura de anillo heteroheptamérico (Benchaouir and Goyenvalle 2012). La U7 snRNP normalmente participa en el procesamiento del pre-mRNA de histonas y es la única que presenta un núcleo formado por 5 proteínas Sm (B/B', D3, G, E y F) y dos proteínas Lsm (Lsm 10 y Lsm 11). Sin embargo, puede ser utilizado como una herramienta para la modulación del *splicing* modificando en el snRNA el sitio de unión para las proteínas Sm/Lsm (U7SmOPT snRNA), resultando en partículas snRNP que se acumulan mas eficientemente en el núcleo y dejan de ser funcionales en el procesamiento del RNA en histonas (Schumperli and Pillai 2004).

La tecnología U7SmOPT snRNA se probó por primera vez en un modelo *in vitro* de β -talasemia, donde el uso de un U7 snRNA modificado junto con la secuencia antisentido dirigida al sitio crítico de *splicing* creado por una mutación en el gen de la β -globina, resultó en una corrección del 65% del *splicing* aberrante (Gorman et al. 1998). Desde entonces, los estudios usando U7SmOPT snRNA han ido en aumento permitiendo corregir con éxito mutaciones en varias enfermedades hereditarias, incluida la DMD (Goyenvalle, Wright, et al. 2012) y la SMA (Odermatt et al. 2016). Para su uso *in vivo*, el sistema de U7SmOPT snRNA puede insertarse en diferentes virus, incluidos los retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados (AAV). Estos últimos son de particular interés puesto que pueden dirigirse a una amplia gama de tejidos,

y además es relativamente seguro ya que es poco probable que se integre en el genoma, y el transgén se puede expresar durante periodos prolongados (Kotterman and Schaffer 2014; Imbert et al. 2017). En DMD se utilizaron con éxito los vectores virales codificantes para U7SmOPT snRNA fusionado con la secuencia de un AON específico dirigido a secuencias reguladoras del exón mutado para el gen de la distrofina en el modelo murino *mdx*. Esta estrategia promovió el *skipping* del exón y la recuperación de una distrofina funcional en dicho modelo *mdx* y en un doble *knockout* para utrofina y distrofina con un fenotipo más severo (Goyenvalle et al. 2004; Goyenvalle, Wright, et al. 2012). En SMA el uso de U7 snRNA modificado fusionado a un AON dirigido a un ISS en la unión intrón 7/exón 8 resultó en la inclusión del exón 7 y en un aumento de la proteína SMN *in vitro*, en fibroblastos derivados de pacientes (Geib and Hertel 2009). Asimismo, esta estrategia fue utilizada *in vivo*, en ratones recién nacidos donde el U7SmOPT snRNA fusionado a un AON dirigido en este caso a un ESS en el exón 7 fue administrado mediante una inyección intracerebroventricular, conduciendo a un aumento significativo de la supervivencia y a una mejora de las funciones musculares (Odermatt et al. 2016).

Sin embargo, los vectores virales, y en particular los AAVs, poseen todas las desventajas de la terapia génica, es decir, estimulan una importante respuesta del sistema inmune frente a las proteínas de la cápsida, y al no integrar el material genético en el genoma celular se observa una disminución en la expresión del transgén a lo largo del tiempo como consecuencia de la división celular (Kotterman and Schaffer 2014). Como alternativa a los vectores virales, se han desarrollado vectores plasmídicos no virales, los minicírculos (MCs), compuestos solamente de secuencias eucariotas, con objeto de mejorar la eficiencia de transferencia y la expresión génica, y la seguridad en terapia génica (Darquet et al. 1997). El plásmido parental de origen está constituido por un *cassette* de expresión flanqueado por sitios de recombinación. Fuera de estos sitios se encuentra el origen de replicación y los genes de resistencia a antibióticos, elementos indispensables para la amplificación del DNA bacteriano pero redundantes para las células eucariotas (Kay et al. 2010). La inducción de la recombinación del plásmido parental resulta en dos moléculas de DNA circulares: una que incluye los elementos bacterianos no deseados (miniplásmido) y otra que contiene el *cassette* de expresión eucariota (minicírculo), compuesto solamente del gen de interés con las secuencias reguladoras correspondientes. Esto produce una reducción considerable del tamaño del vector que facilita la transferencia de genes a células eucariotas y aumenta la eficacia de la transfección (Ata-Abadi NS 2017). Los MCs han demostrado ser eficaces en terapia génica. Un ejemplo de ello es el estudio realizado en un modelo murino de PKU mediante la administración de un MC que expresan el cDNA de la PAH junto con un promotor específico de hígado. Este estudio reveló una normalización de los niveles de Phe en sangre, en

relación con la reversión de la hipopigmentación durante más de 1 año (Viecelli et al. 2014). Por otro lado, se ha probado su eficacia en la modulación del *splicing* utilizando un MC codificante para el U7SmOPT snRNA fusionado a un AON dirigido al gen de la luciferasa, resultando en vectores de 650 pb (microMCs o miMCs). Estos miMCs tienen un potente efecto sobre el *splicing in vitro* e *in vivo* tras su administración en modelos murinos mediante inyección hidrodinámica (Stenler, Wiklander, et al. 2014).

3.2.2. Sobreexpresión de U1 snRNA

Gran parte de las mutaciones de *splicing* causantes de enfermedad afectan al sitio 5' donador de *splicing* (Krawczak et al. 2007), dificultando el inicio de la formación del espliceosoma, que se produce a través del reconocimiento de este sitio 5' por U1 snRNP. El U1 snRNA tiene 164 pb de longitud y está asociado con siete proteínas Sm (B/B', D3, G, E, F, D2 y D1) y tres proteínas específicas de U1, U1-70K, U1-A y U1-C (Egloff et al. 2008). El extremo 5' del U1 snRNA se une por complementariedad al sitio 5' natural de *splicing*, que abarca los 3 últimos nucleótidos del exón y los 6 primeros nucleótidos del intrón, siendo la secuencia consenso CAG/GURAGU, donde la R es una purina. Es probable que sea necesario un mínimo de 5-6 bases de unión con U1 snRNA para que el sitio 5' sea funcional, pero las diferentes posiciones de los nucleótidos no son funcionalmente equivalentes ni están igualmente conservadas. Entre los nueve nucleótidos, las posiciones más conservadas son los dos primeros nucleótidos intrónicos (+1 y +2), y la secuencia GU en estas posiciones representa aproximadamente el 99% de todos los sitios 5' de *splicing*. Las posiciones -1G (último nucleótido del exón) y +5G, la cual forma una fuerte unión con U1 snRNA, están altamente conservadas (Carmel et al. 2004; Roca et al. 2013). Las mutaciones que reducen la complementariedad con U1 snRNA generalmente causan defectos de *splicing*, e incluso mutaciones como +3A>G, donde +3G está presente en aproximadamente la mitad de los sitios de *splicing* funcionales, pueden causar una inactivación completa (Madsen et al. 2006; Roca et al. 2008).

En los últimos años, son varias las evidencias que respaldan el uso de U1 snRNA con un extremo 5' perfectamente complementario con los sitios 5' de *splicing* mutantes, como una estrategia para corregir eficazmente los defectos de *splicing* de las mutaciones del sitio 5' natural tanto *in vitro* (Pinotti et al. 2008; Tanner et al. 2009; Matos et al. 2014) como *in vivo* (Balestra et al. 2014; Lee et al. 2016). Sin embargo, el U1 snRNA adaptado puede interactuar inespecíficamente con otros sitios 5' de *splicing*, alterando así la regulación del *splicing* y pudiendo afectar a la expresión de otros genes (Balestra et al. 2014). Sin embargo, se ha demostrado que los U1 snRNAs complementarios a las secuencias intrónicas corriente abajo del sitio 5' de *splicing* aumentan el reconocimiento del sitio 5' natural de *splicing* (Cohen et al. 1994; Hwang and Cohen 1997).

Posteriormente, Pagani y sus colaboradores desarrollaron la estrategia de U1 snRNA específico del exón (ExSpeU1) con una cola en el extremo 5' diseñada para su unión a secuencias intrónicas no conservadas corriente abajo del exón, que fueron capaces de corregir diferentes mutaciones que provocan el *skipping* del exón localizadas en sitios exónicos o intrónicos (Fernandez Alanis et al. 2012; Dal Mas et al. 2015; Rogalska et al. 2016). En este caso, la unión de U1 snRNA media la activación del sitio 5' de *splicing* favoreciendo así la definición del exón e intrón. Recientemente, se están ensayando terapias genéticas con U1 snRNA adaptados a la mutación en modelos animales, donde los ExSpeU1 se ensamblan como partículas de tipo U1 y la recuperación del *splicing* aberrante depende de la proteína U1 snRNP 70 (U1-70K) y de la cuarta horquilla del U1 snRNA (Rogalska et al. 2016). Es probable que ExSpeU1 reclute factores de *splicing* que luego activan los sitios 5' de *splicing* mutados, aunque el mecanismo exacto no está claro. Sin embargo, aunque la terapia mediada por U1 tiene la ventaja de mantener la expresión regulada de genes defectuosos, su precisión y eficacia deben mejorarse antes de que sea posible la aplicación clínica de esta técnica.

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo ha sido la identificación y caracterización de mutaciones de *splicing* en pacientes con HFA y el análisis de estrategias terapéuticas dirigidas a corregir su efecto.

Para ello se propusieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Análisis funcional y uso de terapias específicas de RNA para nuevas variantes de *splicing* identificadas en el gen *PTS*.
2. Uso de micro-minicírculos como estrategia de vehiculización de AONs.
3. Búsqueda mediante secuenciación masiva de variantes intrónicas profundas en el gen *PAH* en pacientes HFA con genotipo incompleto y análisis funcional para confirmar el posible efecto patogénico.
4. Análisis funcional de nuevas variantes de *splicing* identificadas en el gen *PAH* y elucidación del mecanismo por el que causan el defecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

En esta sección se especifican los detalles técnicos de los materiales utilizados, distinguiendo por la naturaleza de éstos y no por el empleo de los mismos, que se abordará en el siguiente punto.

1.1. Pacientes y líneas celulares

En este trabajo se han incluido muestras biológicas de 8 pacientes, 7 con PKU y 1 con deficiencia en la enzima PTPS. Para los análisis genéticos se partió de DNA o RNA extraídos de fibroblastos de piel o sangre. Para los estudios celulares se han utilizado fibroblastos cultivados obtenidos de biopsia de piel. La línea de fibroblastos control empleada, CC2509, fue obtenida de la casa comercial Lonza. Los pacientes se diagnosticaron en base a su sintomatología clínica y análisis bioquímico, enzimático y/o genético en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM, Madrid).

Las líneas establecidas utilizadas para el estudio con minigenes fueron, COS7, derivadas de riñón de mono verde y Hep3B, procedente de hepatoma humano. Para el análisis *in vivo* de los transcritos endógenos de la PAH se empleó HepG2, procedente también de hepatoma humano y una muestra de hígado humano de un individuo sin HFA.

Todo el material biológico de pacientes fue obtenido con consentimiento informado y autorizado por los padres, y por el hospital que remitió las muestras. Toda la investigación llevada a cabo con este material está autorizada por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, respetando los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos.

1.2. Cepas bacterianas

Las distintas cepas de *E.coli* utilizadas para la producción de miMCs, mutagénesis dirigida o para la construcción de minigenes fueron las siguientes.

Tabla 2. Cepas bacterianas

Nombre	Descripción	Origen
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
XL10-Gold	TetrΔ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac Hte [F' proAB lacI qZΔM15 Tn10(Tet ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene
ZYCY10P3S2T	Cp8.araE ΔendA bla.lacY A177C 3BAD.I-SceI 2BAD.ΦC31 4BAD.Φ31	Dr. Mark A Kay

1.3. Vectores plasmídicos

A lo largo de este trabajo hemos utilizado distintos vectores para la formación de miMCs y para la clonación y construcción de minigenes.

Tabla 3. Vectores plasmídicos

Plásmido	Descripción	Uso	Origen
pmiMC_U7asLuc705	Vector con el U7 snRNA clonado junto a la secuencia antisentido para Luc	Minicírculos	Dr. Sofia Stenler
pSPL3	Vector de <i>splicing</i>	Minigenes	Life Technologies
pcDNA3.1 PAH WT	Vector que contiene un fragmento de gDNA del gen <i>PAH</i>	Minigenes	Dr. B. Andresen
pIV1	Vector que contiene un fragmento de gDNA del gen <i>PTS</i> dentro del vector pCR3.1 (Invitrogen)	Minigenes	Prof. Beat Thöny
pGEMT	Vector de clonación	Clonación	Promega
pG3U1	Vector con el U1 snRNA clonado	Sobreexpresión de factores de <i>splicing</i>	Dr. F. Pagani
pSRSF1, pSRSF2, pSRSF5, pSRSF6, phnRNPA1	Vectores portadores de la secuencia codificante para los distintos factores de <i>splicing</i>	Sobreexpresión de factores de <i>splicing</i>	Dr. Adrian Krainer
p9G8-pXJ42	Vector portador de la secuencia codificante para SRSF7	Sobreexpresión de factores de <i>splicing</i>	Dr. James Stevenin
pCI-Htra2-beta1	Vector portador de la secuencia codificante para Tra2β	Sobreexpresión de factores de <i>splicing</i>	Dr. Brunhilde Wirth

1.4. Reactivos y otros materiales

Las tablas 4 a 6 recogen la información relativa a los reactivos, kits y demás tampones y soluciones empleados en este trabajo.

Tabla 4. Reactivos

Reactivo/Producto	Referencia	Casa Comercial	Uso/Aplicación
4-12% NuPage Precast Gels	NP0323	Invitrogen	Western Blot
2-propanol	109634	Merck	Aislamiento de RNA
Agarose D1 Low EEO	8010	Conda	Análisis de productos de PCR
Amersham ECL™ Blocking Agent	RPN2125	GE Healthcare Life Science	Western Blot
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt trihydrate (ATP)	10127523001	Roche	RNA Affinity
Cloroformo	102445	Merck	Aislamiento de RNA
Complete mini EDTA free	11 836 170 001	Roche	Extracción de proteínas
Coomassie Brilliant Blue R250	12553	Merck	Tinción de geles de poliacrilamida
DTT (ditiotreitól)	D9163	Sigma Aldrich	Western Blot
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Servicio cultivos del CBMSO		Cultivos celulares
EcoRI	ER0271		Thermo Fisher Scientific

Reactivo/Producto	Referencia	Casa Comercial	Uso/Aplicación
Endo-porter	7,084,248 B2	Gene-tools	Transfección de PMO
Etanol	100983	Merck	Aislamiento de RNA
Fast Start TAQ DNA Polymerase	12032945001	Roche	Amplificación de ácidos nucleicos
FBS (Fetal Bovine Serum)	F-7524	Sigma Aldrich	Cultivos celulares
Glutamina	25030-081	Gibco BRL	Cultivos celulares
Hela Nuclear Extract 5Ex9	cc-01-20-50	CilBiotech	RNA Affinity
Heparin sodium salt 25 KU	H3149	Sigma Aldrich	RNA Affinity
JetPEI	101-10N	Polyplus Transfection	Transfección de DNA
L-arabinose	A3256	Sigma Aldrich	Producción de miMCs
Lipofectamin 2000	11668027	Invitrogen	Transfección de DNA
Luminata™ Forte Western HRP substrate	WBLUF0100	Millipore	Western Blot
Magnetic beads	LSKMAG10	Millipore	RNA Affinity
Membrana de PVDF	IPVH00010	Millipore	Western Blot
MEM (Minimum Essential Medium)	10600001	GE HealthcareLife Science	Cultivos celulares
MOPS	M1254	Sigma Aldrich	Western Blot
NuPAGE Antioxidant	NP0005	Invitrogen	Western Blot
OptiMEM I Reduced Serum Medium (1X) Liquid-with Glutamine	31985-062	Invitrogen	Transfección cultivos
Películas de rayos X RP2 PLUS	ENKLT	Agfa	Inmunodetección
Puomicina	P7255	Sigma Aldrich	Inhibición NMD
Recombinant RNasin/RNase inhibitor	N2615	Promega	RNA Affinity
SDS (sodio dodecilsulfato)	L4390	Sigma Aldrich	Western Blot
SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard	LC5925	Life Technologies	Western Blot
SNAP i.d Mini Blot Holders	SNAP2BHMN0100	Millipore	Western Blot
TGS 10X	161-0772	BioRad	Western Blot
Tripsina	Servicio cultivos del CBMSO		Cultivos celulares
Trizol	15596028	Life Science	Aislamiento de RNA
Trypan blue 0,4%	T8154	Sigma Aldrich	Marcador de viabilidad
TSAP	M991A	Promega	Defosforilación pSPL3
Tween-20	P1379	Sigma Aldrich	Western Blot
XT Reducing Agent 20X	1610792	BioRad	RNA Affinity
XT Sample Buffer 4X	1610791	BioRad	RNA Affinity
Yeast tRNA	AM7119	Ambion	RNA Affinity

Tabla 5. Kits comerciales

Kit	Referencia	Casa comercial	Uso
Cycle Pure Kit	D6492-02	Omega	Purificación producto de PCR
MagNA Pure Compact DNA Isolation Kit-large volumen	3730972001	Roche	Aislamiento de gDNA de sangre total
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	3730964001	Roche	Aislamiento de gDNA a partir de fibroblastos
MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit	4802993001	Roche	Aislamiento de RNA
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit-lysis y binding buffer refill	3246752001	Roche	Aislamiento de gDNA de sangre en papel
Nextera Rapid capture	ID.49418	Illumina	Secuenciación masiva
NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit	MB12502	NZYTech	RT-PCR
pGEM® -T Easy Vector System I	A1360	Promega	Clonación de productos de PCR
Quant-iT™ Picogreen™ dsDNA Assay kit	P7589	Invitrogen	Cuantificación de DNA
Quiagen Plasmid Purification Maxi Kit	12163	Quiagen	Aislamiento de DNA plasmídico - Maxiprep
Quiagen Plasmid Purification Mega Kit	12183	Quiagen	Aislamiento de DNA plasmídico (miMCs)
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Quiagen	Purificación de banda en gel
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	210519	Agilent Technologies	Mutagénesis
Rapid DNA ligation kit	11635379001	Roche	Clonación de productos de PCR
Wizard Plus Miniprep DNA Purification System	A1330	Promega	Aislamiento de DNA plasmídico - Miniprep

Tabla 6. Soluciones y tampones

Solución	Composición	Uso
High Salt binding buffer 1X	binding buffer 1X, KCl 3 M	RNA Affinity
Tampón de afinidad	58 µL extracto nuclear, 3 µL RNAsin, 138,5 µL binding buffer 4X, 2,97 µL tRNA (10 µg/µL), 4,5 µL ATP 0,1 M, 33 µL heparina (177 U/mg) y 342 µL agua-DEPC	RNA Affinity
Tampón de unión 4X	Hepes/KOH 1 M pH 7,9, KCl 3 M, MgCl ₂ 1 M, MgAc 1 M, DTT 0,1 M, glicerol 50%, agua-DEPC	RNA Affinity
Tampón de transferencia	100 mL TGS 10X, 200 mL etanol, 700 mL agua miliQ, 1 mL NuPAGE Antioxidant	Western Blot
Tampón de electroforesis MOPS SDS 20X	MOPS 50 mM, Tris base 50 mM, SDS 0,1%, EDTA 1 mM	Western Blot
Solución de Coomassie	Coomassie 0,1%, metanol 50%, ácido acético glacial 10%, agua miliQ	Western Blot
Solución de destinción	metanol 40%, ácido acético glacial 10%, agua miliQ	Western Blot
Solución de lavado	TBS 1X, Tween-20 0,1%	Lavado de membranas Western Blot
Solución de bloqueo	Amersham ECL™ Blocking Agent, TBS 1X, Tween-20 0,1%, TAE	Bloqueo de membranas Western Blot
TAE	Tris-Acetato 40 mM, EDTA 2 mM	Electroforesis de ácidos nucleicos
TBS	Tris-HCl 50 mM, NaCl 276 mM, KCl 54 mM pH 8	Varios

1.5. Anticuerpos

Hemos utilizado en el experimento de *RNA Affinity* los siguientes anticuerpos para la detección de las proteínas indicadas en la **Tabla 7**, en las condiciones que en la misma se especifican.

Tabla 7. Anticuerpos

Anticuerpo	Proteína/Diana	Especie/descripción	Uso/dilución	Referencia	Casa comercial
Anti-SRSF1	SF2/ASF (SRSF1)	Ratón, mAb	WB, 1:1.000	32-4500	Invitrogen
Anti-SC-35	SC-35 (SRSF2)	Ratón, mAb	WB, 1:1.000	04-1550	Millipore
Anti-SRp40	SRp40 (SRSF5)	Ratón, mAb	WB, 1:1.000	H00006430-B01	Abnova
Anti-9G8	9G8 (SRSF7)	Cabra, pAb	WB, 1:1.000	sc-10244	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SR	SRp75, SRp55, SRp40, SRp20, U1 snRNP70K and U2AF	Ratón, mAb	WB, 1:500	33-9300	Invitrogen
Anti-Tra2 β	Tra2 β	Cabra, pAb	WB, 1:250	sc-33318	Santa Cruz Biotechnology
Anti-U1 snRNP70	U1 snRNP70	Cabra, pAb	WB, 1:1.000	sc-9571	Santa Cruz Biotechnology
Anti-hnRNP A1	hnRNP A1	Ratón, mAb	WB, 1:1.000	R9778	Sigma Aldrich
Anti-hnRNP A2/B1	hnRNP A2	Ratón, mAb	WB, 1:500	sc-53531	Santa Cruz Biotechnology
Anti-hnRNP I	hnRNP I	Cabra, pAb	WB, 1:1.000	sc-16547	Santa Cruz Biotechnology
Anti-hnRNP L	hnRNP L	Ratón, mAb	WB, 1:1.000	sc-32317	Santa Cruz Biotechnology
Anti-hnRNP K	hnRNP K	Ratón, mAb	WB, 1:1.000	sc-28380	Santa Cruz Biotechnology
Anti-hnRNP H	hnRNP H	Cabra, pAb	WB, 1:1.000	sc-10042	Santa Cruz Biotechnology
Anti-hnRNP E2	hnRNP E2	Ratón, mAb	WB, 1:1.000	sc-101136	Santa Cruz Biotechnology
Anticuerpos secundarios					
Anti-ratón-IgG-HRP	IgG ratón	Cabra	WB, 1:10.000	sc-2031	Santa Cruz Biotechnology
Anti-cabra-IgG-HRP	IgG cabra	Mono	WB, 1:5.000	sc-2056	Santa Cruz Biotechnology

1.6. Oligonucleótidos

Para la amplificación de DNA o cDNA, secuenciación, mutagénesis dirigida y otros experimentos de purificación de proteínas de RNA y recuperación del correcto procesamiento del mRNA se han utilizado los siguientes oligonucleótidos.

Tabla 8. Oligonucleótidos

Tabla 8.1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de DNA o cDNA.

Gen/vector	Nombre	Secuencia 5'-3'	Uso
pMC_U7asLuc	snRNAU7asLuc S	TCCCAGATAAACTCAATGATGAT	Amplificación DNA plasmídico
pMC_U7asLuc	snRNAU7asLuc AS	CCCCCTGCAGAGACTAGACA	Amplificación DNA plasmídico
pMC_U7asLuc	asLuc S	AGAGTCGACGCAGAAAGGAA	Secuenciación
pMC_U7asLuc	asLuc AS	CTGTTTTCAGCCAATCAGCA	Secuenciación
pSPL3	SD6 S	TCTGAGTCACCTGGACAACC	RT-PCR Minigenes
pSPL3	SA2 AS	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC	RT-PCR Minigenes
pcDNA3.1	PAH 10-11-12 S	GGTAACGGAGCCAACATGGTTTACTG	RT-PCR Minigenes
pcDNA3.1	PAH 10-11-12 AS	AGACTCGAGGGTAGTCTATTATCTGTT	RT-PCR Minigenes
PAH	PAH intrón 2 S	AATCTGAGGGTGGCATGGAAT	Amplificación intrón 2
PAH	PAH intrón 2 AS	AGGAAACACCCCACTTTCC	Amplificación intrón 2
PAH	PAH intrón 6 S	CTCCAGCCCTACTGTGTTT	Amplificación intrón 6
PAH	PAH intrón 6 AS	GGACCTCATTCCAGTCTGCT	Amplificación intrón 6
PAH	PAH 103248312 S	GCCCTGTAGTTCTCTGCTGTG	Secuenciación
PAH	PAH 103248312 AS	AACTGTCCTGGCTACAACCTCC	Secuenciación
PAH	PAH 103290290 S	AAATCTGAGGGTGGCATGG	Secuenciación
PAH	PAH 103290290 AS	AGGGCAGATTGCAGGACTAA	Secuenciación
PAH	PAH 103308460 S	TGAGGGGAACAAACATTTCC	Secuenciación
PAH	PAH 103308460 S	AACCCTGCCAGAGAGGTACA	Secuenciación
PAH	PAH ex8	CATGTGCCCTTGTTTTCAG	Amplificación cDNA
PAH	PAH 3'UTR	TTCACAGCTGACAGACCACA	Amplificación cDNA
PAH	11A-PAH	TGAGAGAAGGGGCACAAATG	Amplificación exón 11
PAH	11B-PAH	GTAGACATTGAGTCCACTCT	Amplificación exón 11
PAH	PAH intrón 10 F	ACTGTGGAGTTTGGGCTCTG	Amplificación cDNA
PAH	PAH intrón 10 R	ATGGCTGTCTTCTCCAGCTC	Amplificación cDNA
PAH	PAH intrón 11 F	CCTGGAGCTGGAGAAGACAG	Amplificación cDNA
PAH	PAH intrón 11 R	ACTGAGAAGGGCCGAGGTAT	Amplificación cDNA
pCR3.1	PL3	GGGAGACCCAAGCTGGCTA	RT-PCR Minigenes
pCR3.1	PL4b	AGTCGAGGCTGATCAGCGG	RT-PCR Minigenes
PTS	PTS ex2 S	CTGTTTGGGAAATGCAACAA	Secuenciación
PTS	PTS ex4 AS	CAGCCAGATTTCATAACCATTC	Secuenciación
PTS	PTS ex4 F	GCTTCCATGCTGAGGTCAAT	Amplificación exón 4
PTS	PTS ex4 R	ACTATTCCCCAACCCACA	Amplificación exón 4
PTS	PTS cDNA F	ATGAGCACGGAAGGTGGTG	Amplificación cDNA
PTS	PTS cDNA ex3 R	CTCTCCATGTACTGTACCACAA	Amplificación cDNA
PTS	PTS cDNA ex5 R	ATGATCAAGGGGCTGCATAA	Amplificación cDNA
PTS	PTS cDNA 5-6B	CTCCAGAGCACAATGTGTACG	Amplificación cDNA
	T7 new FW	TAATACGACTCACTATAGGGAG	Secuenciación
	SP6 new R	CTAGCATTTAGGTGACACTATAG	Secuenciación

Tabla 8.2. Oligonucleótidos específicos empleados en la mutagénesis dirigida.

Gen	Nombre	Secuencia 5'-3'
Luc	asLucdel 1011-1031 S	CCGAAGTCAGAAAACGAGCTCCAAAAATTAGATCTTGCGGAAAG
Luc	asLucdel 1011-1031 AS	CTTTCCGCAAGATCTAATTTTGGAGCTCGTTTCTGACTTCGG
Luc	ins PMO-ex11 Pah S	CCGAAGTCAGAAAACGAGCTCCAAAAATTGTAAGGTGAGGTGGTGAC AAAGGTGAGATCTTGCGGAAAG
Luc	ins PMO-ex11 Pah AS	CTTTCCGCAAGATCTCACCTTTGTCACCACCTCACCTTACAATTTTGGGA GCTCGTTTCTGACTTCGG
PAH	PAH c.169-1594T>C S	ATAAACTTTAAGGGATAAGATGGACCAAGCAAGTCCTGTCAAG
PAH	PAH c.169-1594T>C AS	CTTGACAGGACTTGCTTGGTCCATCTTATCCCTTAAAGTTTAT
PAH	PAH c.706+602G>C S	CAGTCCAAATTCAGTGAATACCTGCTGTATATGCAAGACTG
PAH	PAH c.706+602G>C AS	CAGTCTTGCATATACAGCAGGTATTCAGTGAATTTGGACTG
PAH	PAH c.1199+17 G>A S	GTGAGGTGGTGACAAAGTGAGCCACTAGCTC
PAH	PAH c.1199+17 G>A AS	GAGCTAGTGGCTCACTTTTGTACCACCTCAC
PAH	PAH c.1199+20 G>C S	GTGAGGTGGTGACAAAGGTGAGCCACTAGCTC
PAH	PAH c.1199+20 G>C AS	GAGCTAGTGGCTGACCTTTGTACCACCTCAC
PAH	PAH delCAAAGGT S	AAGGTGAGGTGGTGAGAGCCACTAGCTCTG
PAH	PAH delCAAAGGT AS	CAGAGCTAGTGGCTCTCACCACCTCACCTT
PAH	PAH delGAGCC S	AGGTGAGGTGGTGACAAAGGTACTAGCTCTGGG
PAH	PAH delGAGCC AS	CCCAGAGCTAGTACCTTTGTACCACCTCACCT
PAH	PAH delGGTGAG S	AAGTAAGGTGAGGTGGTGACAAACCACTAGCTCTG
PAH	PAH delGGTGAG AS	CAGAGCTAGTGGTTTGTACCACCTCACCTTACTT
PAH	PAH 5'splice site ex11 S	GAGTTTAAATGATGCCAAGGAGAAAGTAAGGTAAGTTGGTGAC
PAH	PAH 5'splice site ex11 AS	GTCACCAACTTACCTTACTTTCTCCTTGGCATCATTAAACTC
PAH	PAH c.1199+18 G>C F	GAGGTGGTGACAAAGCTGAGCCACTAGCTCT
PAH	PAH c.1199+18 G>C R	AGAGCTAGTGGCTCAGCTTTGTACCACCTC
PAH	PAH c.1199+15A>C_+20G>A F	GAAAGTAAGGTGAGGTGGTGACACAGGTAAGCCACTAGCTC
PAH	PAH c.1199+15A>C_+20G>A R	GAGCTAGTGGCTTACCTGTGTACCACCTCACCTTACTTTC
PAH	PAH 1 spacer F	GGTGAGGTGGTGACAGTGACAAAGGTGAGCCACTAG
PAH	PAH 1 spacer R	CTAGTGGCTCACCTTTGTCACTGTACCACCTCAC
PAH	PAH 3 spacer F	AGGTGAGGTGGTGACAGTGACAGTGACAGTGACAAAGGTGAGCCACT AGC
PAH	PAH 3 spacer R	GCTAGTGGCTCACCTTTGTCACTGTCACTGTCACTGTACCACCTCACCT
PAH	PAH 6 spacer F	AGGTGAGGTGGTGACAGTGACAGTGACAGTGACAGTGACAGTGACA GTGACAAAGGTGAGCCACTAGC
PAH	PAH 6 spacer R	GCTAGTGGCTCACCTTTGTCACTGTCACTGTCACTGTCACTGTCACTGT CACTGTACCACCTCACCT
PTS	PTS c.164-672 C>T F	GCTGAGATTACAGGTGCCCGCCACTATGC
PTS	PTS c.164-672 C>T R	GCATAGTGGCGGGCACCTGTAATCTCAGC
PTS	PTS c.243+3 A>G F	CTCAAAAAATATATGGAGGTGATGGCATGTTGGGTCTAGAG
PTS	PTS c.243+3 A>G R	CTCTAGACCCAACATGCCATCACCTCCATATATTTTGTAG
U1	U1snRNA PTS c.243+3 F	GGGCAGAGGCCCAAGATCTCATCATCACCTCGCAGGGGAGATACC
U1	U1snRNA PTS c.243+3 R	GGTATCTCCCCTGCGAGGTGATGATGAGATCTTGGGCTCTGCC

Tabla 8.3. Oligonucleótidos de RNA biotinilados usados en la purificación de proteínas de unión a RNA.

Gen	Nombre	Tipo	Secuencia 5'-3'	Uso	Origen
PAH	WT	RNA	Biotina-UGACAAAGGUGAGCCACUAG	RNA Affinity	DNA Technology
PAH	MUT+17	RNA	Biotina-UGACAAAAGGUGAGCCACUAG	RNA Affinity	DNA Technology
PAH	MUT+20	RNA	Biotina-UGACAAAGGUCAGCCACUAG	RNA Affinity	DNA Technology

Tabla 8.4. Oligonucleótidos antisentido utilizados para el correcto procesamiento del mRNA.

Gen	Nombre	Tipo	Secuencia 5'-3'	Uso	Origen
PTS	PTPS PMO	PMO	AGGCTGGAGAATCGCACGAACCTGG	Exclusión pseudoexones	GeneTools
PTS	PTPS VPMO	VMO	AGGCTGGAGAATCGCTCGAACCTGG	Exclusión pseudoexones	GeneTools
PTS	2'OMePS 1	2'OMePS	AGGCTGGAGAATCGCTCGAACCTGG	Exclusión pseudoexones	Sigma
PTS	2'OMePS 2	2'OMePS	GTGGCGGGCACCTGTAATCT	Exclusión pseudoexones	Sigma
PTS	2'OMePS Scrambled	2'OMePS	CTCAATATGCTACTGCCATG	Control negativo	Sigma

1.7. Equipos

Aunque algunos equipos de uso habitual en el laboratorio no se especifican en la tabla, la mayoría de los equipos empleados para la realización de los diferentes experimentos se recogen en ella.

Tabla 9. Equipos

Equipo	Casa comercial	Aplicación
Espectrofotómetro de UV Vis Evolution™ 300	Thermo Fisher Scientific	Cuantificación de proteínas
IbLot 2	Invitrogen	Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa
Bio-Rad gel doc station	BioRad	Obtención de imágenes reproducibles de geles
MagNA Pure Compact	Roche	Aislamiento de ácidos nucleicos
NanoDrop One	Thermo Fisher Scientific	Cuantificación de ácidos nucleicos
Qubit®	Invitrogen	Cuantificación de ácidos nucleicos
SNAP i.d 2.0 Protein Detection System	Millipore	Detección de proteínas
SpeedVac	Savant	Concentración de ácidos nucleicos
Veriti® Thermal Cycler	Applied Biosystems	Amplificación de ácidos nucleicos
XCell SureLock Mini-Cell System	Invitrogen	Western Blot
XCell II BLot Module	Invitrogen	Western Blot

1.8. Soporte informático y análisis *in silico*

A lo largo de este trabajo son muchos los programas informáticos y bases de datos que se han utilizado para darnos una primera aproximación de los estudios realizados o simplemente para proporcionar información complementaria.

Tabla 10. Programas y bases de datos

Tabla 10.1. Programas

Nombre	Aplicación	URL
Alamut	Análisis de mutaciones	Alamut® Visual version 2.11 (Interactive Biosoftware, Rouen, France)
BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project)	Predicción de sitios conservados de <i>splicing</i>	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
BLAST	Alineamiento de secuencias	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Chromas	Análisis de secuencias nucleotídicas	https://technelysium.com.au/wp/chromas/
DNA Nexus	Análisis de calidad, alineamiento, anotación y análisis de variantes de secuenciación masiva	https://www.dnanexus.com/
ESE Finder 3.0	Predicción de secuencias de reconocimiento de factores de <i>splicing</i>	http://krainer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home
Exon Primer	Diseño de oligonucleótidos	https://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html
HSF3.1 (Human Splicing Finder)	Análisis de mutaciones de <i>splicing</i>	http://www.umd.be/HSF3/
ImageJ	Cuantificación de bandas de WB	https://imagej.nih.gov/ij/download.html
Image Lab 5.2	Cuantificación de bandas de geles de agarosa	http://www.bio-rad.com/es-es/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z
MaxEntScan	Predicción de sitios conservados de <i>splicing</i>	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
Mutalyzer	Comprobación de la nomenclatura de las mutaciones	https://mutalyzer.nl/
Primer 3	Diseño de oligonucleótidos	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
Quantity One	Cuantificación de bandas de WB	http://www.bio-rad.com/es-es/product/quantity-one-1-d-analysis-software?ID=1de9eb3a-1eb5-4edb-82d2-68b91bf360fb
RepeatMasker	Búsqueda de secuencias repetidas de DNA	http://www.repeatmasker.org/
SNPCheck 3	Comprobación del lugar de hibridación de oligonucleótidos	https://secure.ngri.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm
Variant Studio Data Analysis Software (Illumina)	Análisis de variantes de secuenciación masiva	https://www.illumina.com/informatics/biological-interpretation/variant-analysis.html

Tabla 10.2. Bases de datos

Nombre	Aplicación	URL
dbSNP	Pequeñas variaciones reportadas en el genoma	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
Ensembl	Genomas	https://www.ensembl.org/index.html
GeneCards	Base de datos integrativa	https://www.genecards.org/
gnomAD (Genome Aggregation Database)	Frecuencia alélica	http://gnomad.broadinstitute.org
HGMD (Human Gene Mutation Database)	Mutaciones reportadas en humanos	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee)	Nomenclatura estandarizada de genes	https://www.genenames.org/
NCBI (National Center for Biotechnology Information)	Genomas	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)	Fenotipos de enfermedades genéticas	https://www.omim.org/
UCSC (University of California, Santa Cruz)	Genomas	https://genome.ucsc.edu/

2. Métodos

En este apartado abordamos los métodos que utilizamos a lo largo del trabajo. Se organizan según la finalidad conceptual de los mismos.

2.1. Obtención de micro-minicírculos

2.1.1. Construcción del vector

Para la producción de miMCs se ha empleado el plásmido parental pmiMC-U7asLuc705 (cedido por la Dra. Sofia Stenler) al cual le delecionamos la secuencia correspondiente al gen de la luciferasa, para sustituirlo por nuestra secuencia de interés (correspondiente al oligonucleótido PMO ex11, (Gallego-Villar et al. 2014)) utilizando mutagénesis dirigida con oligonucleótidos específicos (Tabla 8.2).

2.1.2. Generación de bacterias competentes

Las bacterias necesarias para la producción de miMCs son una cepa específica de *E.coli* (ZCYC10P3S2T, cedidas por el Dr. Mark A Kay) que contiene los genes que codifican para integrasas y endonucleasas, necesarias para la formación de los miMCs bajo el promotor pBAD inducible por arabinosa. Para que puedan recibir un DNA exógeno es necesario que dichas bacterias sean competentes. Para ello, se crecieron las bacterias en medio Luria Broth (LB) sin antibióticos toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, el cultivo fue incubado en 1 L de LB sin antibiótico a 37°C en agitación hasta alcanzar un valor de densidad óptica entre 0,4-0,6. Una vez alcanzada, el cultivo se deja enfriar para su posterior centrifugación a 4°C durante 15 min a 3.000 g. Se elimina el sobrenadante, se resuspende en 100 mL de MgCl₂ 100 mM y se centrifuga a 2.000 g durante 15 min a 4°C. Se decanta de nuevo el sobrenadante para resuspender el precipitado en 200 mL de CaCl₂ 100 mM e incubar 20 min en hielo para su posterior centrifugación a 4°C durante 15 min a 2.000 g. Se elimina el sobrenadante, se resuspende en 50 mL de CaCl₂ 85 mM/15% glicerol y se centrifuga a 1.000 g durante 15 min a 4°C. Finalmente, se decanta el sobrenadante, se resuspende en 2 mL de CaCl₂ 85 mM/15% glicerol, se reparte en alícuotas y se congela a -80°C hasta su uso.

2.1.3. Producción de miMCs

La producción de miMCs se hizo conforme al protocolo de (Kay et al. 2010). Brevemente, la cepa de *E.coli* ZCYC10P3S2T transformada con el plásmido parental pmiMC-U7asPMOex11 fue crecida en placas de LB con kanamicina 50 µg/mL a 37°C toda la noche. Las colonias fueron expandidas en 5 mL de medio Terrific Broth suplementado con 50 µg/mL de kanamicina a 37°C

durante 6 h y subsecuentemente expandidas por inoculación de 400 mL de Terrific Broth con 400 μ L de cultivo, seguido de una incubación a 37°C y 225 rpm toda la noche en un matraz de 1 L. Al día siguiente, la formación de miMCs fue inducida por la adición de 400 mL de LB, 16 mL de NaOH 1M y 400 μ L de L-arabinosa 20%. El cultivo fue incubado en matraces de 2 L a 32°C en agitación (220 rpm) durante 6 h. Las muestras tomadas antes y después de la inducción fueron analizadas para verificar que la inducción fue exitosa (**Fig. 11**).

Los miMCs se aíslan utilizando el kit *plasmid MEGA* (Quiagen) siguiendo el protocolo estándar y las recomendaciones de los proveedores. Las cantidades de los tampones de resuspensión, lisis y neutralización se ajustaron al peso del pellet de bacterias, utilizando 10 mL de cada buffer por gramo de pellet y cargado en dos columnas. La fracción monomérica fue purificada a partir de un gel de agarosa del 1% mediante el uso de *QIAquick Gel Extraction Kit*, de acuerdo con el protocolo del fabricante.

2.2. Técnicas de ácidos nucleicos

2.2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

El aislamiento de ácidos nucleicos de las distintas muestras utilizadas en este trabajo se realizó siguiendo el protocolo y las recomendaciones de los proveedores de cada uno de los kits de aislamiento empleados (**Tabla 5**).

2.2.2. Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación y determinación de la pureza de los ácidos nucleicos aislados se realizó en un *NanoDrop One* teniendo en cuenta la relación $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$. Para las muestras empleadas en secuenciación masiva se utilizó *Quant-iT™ PicoGreen®* como agente intercalante de dsDNA y *Qubit®* como medidor de fluorescencia.

El análisis de los fragmentos de gDNA, cDNA y DNA plasmídico se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosas en cubetas de desarrollo horizontal acopladas a una fuente de energía con tampón de electroforesis TAE (**Tabla 6**). Tras la electroforesis, el tamaño de las bandas se analizó con un transiluminador acoplado a una cámara, para comparar, sobre la imagen, las bandas obtenidas con distintos marcadores de peso molecular conocido, *DNA Molecular Weight Marker V* (NZYTech), ϕ 29, y II (CBMSO).

2.2.3. Amplificación de gDNA y cDNA

Amplificación de gDNA: se ha empleado un protocolo de PCR estándar teniendo en cuenta la longitud del amplicón y la temperatura de disociación del par de oligonucleótidos específicos o T_m (**Tabla 8.1**). Se amplificaron entre 250-500 ng de gDNA utilizando la polimerasa *Fast Start TAQ* en un termociclador *Veriti® Thermal Cycler*. Tras la amplificación, los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa adecuado al tamaño esperado con bromuro de etidio (BrEt) al 4% v/v.

Amplificación de cDNA: a partir de 750 ng de RNA total se obtuvo cDNA por retrotranscripción utilizando *NZY First-Strand cDNA System I*, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Posteriormente el cDNA se amplificó mediante PCR con la polimerasa *Fast Start TAQ* y oligonucleótidos específicos (**Tabla 8.1**) en un termociclador *Veriti® Thermal Cycler*. Los productos de PCR se separaron y visualizaron en un gel de agarosa para determinar su tamaño y/o purificar las bandas para su posterior secuenciación.

Los oligonucleótidos específicos se diseñaron con los programas de acceso *on-line Primer 3* o *Exon Primer* y se comprobó que no hibridaban en regiones donde pudiese haber polimorfismos descritos con *SNPCheck 3*.

2.2.4. Purificación de productos de PCR y secuenciación

Tras la amplificación, los fragmentos de DNA se purificaron con *Cycle Pure kit* para su posterior secuenciación. Los fragmentos de DNA separados en geles de agarosa se purificaron utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction*.

Una vez purificados, los fragmentos de DNA se secuenciaron mediante el método enzimático de terminación de cadena de DNA por incorporación de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) descrito por (Sanger et al. 1977). Para ello se emplearon 500 ng de DNA tanto para los productos de PCR como para las construcciones plasmídicas, junto con los oligonucleótidos específicos a una concentración de 5 μ M. Las secuencias, obtenidas de la empresa *Macrogen*, se analizaron con el programa *Chromas*.

2.2.5. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida mediante el proceso de PCR se realizó con el kit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies), siguiendo las indicaciones del proveedor y con oligonucleótidos específicos (**Tabla 8.2**).

Una vez terminada la PCR, se transformaron bacterias *XL10-Gold* (Stratagene), comprobando por secuenciación que el cambio nucleotídico, delección o inserción se había producido correctamente y que no se habían introducido cambios adicionales.

2.2.6. Clonación y análisis de minigenes

Las secuencias de interés a clonar en el vector pSPL3 se amplificaron con oligonucleótidos específicos (**Tabla 8.1**) a partir de gDNA de controles y de los pacientes portadores de los cambios nucleotídicos. Los productos de estas amplificaciones se clonaron en el vector pGEMT (**Tabla 3**) según las recomendaciones del proveedor. Se transformaron bacterias *E.coli XL1 Blue* (**Tabla 2**) y se seleccionaron los clones positivos, mediante escisión con la enzima de restricción *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific). Una vez liberado el fragmento introducido en cada caso se clonaron en el vector pSPL3 digerido previamente con la misma enzima y defosforilado con *TSAP* (Promega), utilizando el kit *Rapid DNA ligation*. Finalmente, las construcciones *wild-type* (wt) y mutantes con orientación correcta se seleccionaron por secuenciación.

2.2.7. Secuenciación masiva

Para la identificación de variantes en regiones intrónicas de 7 pacientes con HFA, con una mutación ya descrita en el gen *PAH*, se usó un panel diseñado en el laboratorio (TES, *Targeted exome sequencing*) que captura el exoma de 121 genes causantes de enfermedades metabólicas hereditarias y en algunos casos también las regiones intrónicas, como es el caso del gen *PAH*.

Se partió de 50 ng de DNA que se purificó con *MagNA Pure Compact*, se cuantificó por fluorometría con *PicoGreen* y su integridad se evaluó con un gel de agarosa 1%. El DNA se fragmentó con transposones que a la vez insertan unos adaptadores y el resultado se analizó en un gel de agarosa 1%. Posteriormente, mediante PCR se unieron otros adaptadores que contienen el índice y unas secuencias complementarias a los oligonucleótidos de amplificación y secuenciación. Los DNAs de todos los pacientes se mezclaron y se realizó la captura de los fragmentos que contienen las regiones de interés con sondas biotiniladas y bolas magnéticas de estreptavidina. La librería se amplificó y se generaron los *cluster* por PCR en puente. La secuenciación por síntesis se realizó con un *MiSeq* (Illumina). Los análisis de calidad de las lecturas, así como el alineamiento y la anotación de variantes se realizaron con el procesador de datos comercial *DNA Nexus*.

Finalmente, las variantes encontradas en cada paciente fueron analizadas usando el programa *VariantStudio Data Analysis Software* (Illumina®). En este programa las variantes se van priorizando a través de distintos filtros hasta seleccionar aquellas que pasaran a un estudio más detallado.

2.3. Técnicas de proteínas

2.3.1. Detección de proteínas unidas a RNA (*RNA affinity*)

Para la purificación de las proteínas unidas a RNA se utilizaron oligonucleótidos biotinilados de RNA como se describe en (Nielsen et al. 2007). Las secuencias de los oligonucleótidos que se muestran en la **Tabla 8.3**, se corresponden a la posición wt, c.1199+17G>A y c.1199+20G>C del mRNA del gen *PAH* humano. Para cada purificación se unieron 10 µL de cada oligonucleótido (100 pmol/µL) a 50 µL de las bolas magnéticas de estreptavidina (Invitrogen), previamente lavadas tres veces con 200 µL de tampón de unión 1X (**Tabla 6**). Esta mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente con el fin de que los oligonucleótidos quedaran unidos a las bolas magnéticas.

A continuación, se eliminó el sobrenadante, se añadieron 500 µL de tampón de afinidad (**Tabla 6**) que contiene el extracto nuclear (EN) y se incubaron 25 min a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de EN se lavaron las bolas magnéticas tres veces con *High salt binding buffer 1X* (**Tabla 6**).

Finalmente, la adición de 50 µL de *Sample buffer 1X* y 2,5 µL *xT Reducing agent (20X)* y, posterior desnaturalización de la muestra hirviendo 4 minutos a 90°C, rompió la interacción RNA-proteínas, permitiendo recoger así el sobrenadante donde se encontraban todas las proteínas de unión a nuestros RNAs de interés.

2.3.2. Separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE

La separación electroforética de las proteínas obtenidas anteriormente se llevó a cabo en sistemas *XCell SureLock Mini-Cell* (Invitrogen). Aproximadamente, 15 µg de extracto nuclear y 5 µL de cada una de las muestras fueron cargadas en geles *NuPAGE Bis-Tris* de gradiente del 4-12% utilizando como tampón de electroforesis *MOPS 1X* (**Tabla 6**). Para determinar los pesos moleculares de las proteínas empleamos como marcador de peso molecular *SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard*. Los geles se corrieron a un voltaje constante (200V) durante 50-60 min. En este punto los geles pueden ser teñidos con *Coomassie* o transferidos a una membrana de PVDF.

2.3.3. Tinción con Coomassie

Los geles fueron teñidos con solución de *Coomassie* (**Tabla 6**) durante 1-2h en suave agitación y desteñidos con solución de destinción (**Tabla 6**) cambiándola periódicamente hasta que el fondo del gel estuviese claro.

2.3.4. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas

Tras la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de PVDF previamente equilibradas (30 seg en etanol, 2 min en agua miliQ, 30 min en buffer de transferencia) con el equipo *XCell II BLot Module* durante 1-1,5 h a 30V.

Después de la transferencia las membranas se lavaron con agua miliQ y se bloquearon con 30 mL de solución de bloqueo (**Tabla 6**) mediante el sistema *SNAP i.d 2.0 Protein Detection* hasta que el pocillo quedase completamente vacío. A continuación, las membranas se incubaron en solución de bloqueo con el anticuerpo primario correspondiente en agitación toda la noche (ver condiciones para cada uno de los anticuerpos utilizados en la **Tabla 7**). Tras la incubación con el anticuerpo primario, en el mismo sistema *SNAP i.d 2.0 Protein Detection*, se lavaron las membranas cuatro veces con 30 mL de solución de lavado (**Tabla 6**) y se incubaron 10 min a temperatura ambiente con 5 mL del anticuerpo secundario (diluido en solución de lavado) añadidos sobre la superficie del *blot holder*. Tras la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente unido a peroxidasa (HRP) se lavaron de nuevo 4 veces con 30 mL de solución de lavado y se realizó la detección por quimioluminiscencia utilizando 2 mL de *LuminataTM Forte Western HRP substrate* e incubando 2 min a RT sobre un papel de acetato.

Las imágenes fueron adquiridas en el equipo *Gel Doc XR+System* (BioRad) y el soporte informático *Quantity One*, también de BioRad. La cuantificación de las bandas se hizo por duplicado calculando los niveles de gris usando el programa *ImageJ*.

2.4. Cultivos celulares

2.4.1. Mantenimiento de los cultivos

Los cultivos primarios procedentes de biopsia de piel, así como las líneas establecidas de hepatoma (Hep3B y HepG2) y COS7 se cultivaron en botellas de 75 cm², placas P100 (Ø 100 mm) o en placas de 6 pocillos P6 (Ø 35 mm). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado con glutamina 2 mM, 5 o 10% suero bovino fetal (FBS) y una mezcla de antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL), en condiciones de cultivo estándar (atmósfera de humedad relativa del 95%, 5% de CO₂ y a 37°C). Las células fueron recogidas con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,02% y sedimentadas mediante centrifugación. Las células se conservan congeladas en suero fetal con DMSO al 5% en N₂ líquido. En todos los ensayos, salvo en los que las diferentes líneas celulares requieran un tratamiento diferente al descrito previamente, las células se encontraban a un 80% de confluencia antes de realizar el experimento.

2.4.2. Transfecciones

Según los experimentos se ha utilizado como reactivo de transfección *JetPEI* o *Lipofectamina 2000*. Para ello, 24 h antes del ensayo se sembraron 300.000-400.000 células por pocillo en placas P6 con 2 mL de MEM suplementado con FBS al 10%, glutamina y antibióticos, de tal manera que estaban a un 80% de confluencia en el momento de la transfección.

El protocolo de transfección seguido con *JetPEI* fue el recomendado por la casa comercial. Se mezclaron 8 µL de *JetPEI* y 2 µg de DNA total (en el caso de las co-transfecciones con dos plásmidos la cantidad de DNA de cada uno es de 1 µg) en 100 µL de NaCl 150 mM cada uno por separado para su posterior mezcla, que se añadió sobre las células plaqueadas tras 30 min de incubación a RT.

En el caso de la *Lipofectamine 2000*, se mezclaron por separado 5 µL de lipofectamina y 2 µg de DNA en 150 µL de optiMEM durante 5 min de incubación. Tras lo cual se mezcló el DNA sobre la lipofectamina para añadirle a las células finalmente 250 µL del mix tras 20 min de incubación.

2.4.2.1. Transfecciones de AONs tipo PMO, VPMO y 2'OMePS

Al igual que en los casos anteriores se plaquearon 300.000-400.000 células por pocillo en placas P6. Al día siguiente, los DNAs plasmídicos (minigenes) fueron transfectados en la línea Hep3B y a las 48 h los AONs; 24 h tras el plaqueo en el caso de los fibroblastos.

• PMO

1. Se cambia el medio por 1 mL de MEM con FBS al 5 o 10% suplementado con glutamina y antibióticos a cada uno de los pocillos.
2. Se añade el PMO (**Tabla 8.4**) (10, 20 o 30 µM, concentración final) directamente a cada pocillo y se mueve ligeramente la placa para favorecer la mezcla.
3. Se añaden 6 µL de *endoporter* a cada pocillo y se mueve rápidamente la placa para que se mezcle bien.
4. Entre 24-48 h después se procede a levantar las células con tripsina para su posterior análisis.

• VPMO

1. Se cambia el medio por 1 mL de MEM con FBS al 5 o 10% suplementado con glutamina y antibióticos a cada uno de los pocillos.
2. Se añade el VPMO (**Tabla 8.4**) (10, 20 o 30 µM, concentración final) directamente a cada pocillo y se mueve ligeramente la placa para favorecer la mezcla.
3. Entre 24-48 h después se procede a levantar las células con tripsina para su posterior análisis.

- **2'-OMePS**

1. Se diluyen 5 μL de lipofectamina en 150 μL de optiMEM, se mezcla bien y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min.
2. Se diluyen el 2'-OMePS (**Tabla 8.4**) (0,3, 0,5 o 1 μM , concentración final) en 150 μL de optiMEM, se mezcla bien y se incuba 5 min a temperatura ambiente. Se añade la mezcla del 2'-OMePS sobre la mezcla de lipofectamina, se mezcla bien y se incuba a temperatura ambiente durante 20 min.
3. Se cambia el medio por 2,5 mL de medio fresco y se añaden 250 μL de la mezcla de transfección a cada uno de los pocillos.
4. Entre 24-48 h después se procede a levantar las células con tripsina para su posterior análisis.

2.5. Análisis estadístico

Todos los valores mostrados son valores promedio de n experimentos desarrollados independientemente. La significancia estadística de las diferencias entre los grupos analizados se obtuvo mediante una prueba *T de Student* de dos colas, realizada mediante el programa *IBM SPSS Statistics v.21*. Las diferencias observadas se consideraron significativas según los p valores $* < 0,05$, $** < 0,01$ y $*** < 0,001$.

RESULTADOS

1. Análisis funcional y aproximaciones terapéuticas para nuevas variantes de *splicing* identificadas en el gen *PTS*

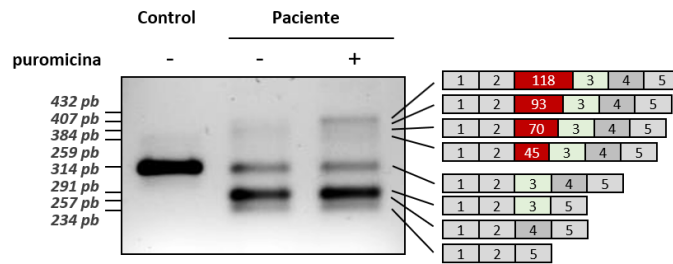
Los defectos de *splicing* contribuyen de manera significativa a las enfermedades humanas; entre un 15-50% de las mutaciones de todas las enfermedades afectan al procesamiento del pre-mRNA (Baralle and Buratti 2017). En esta primera parte del trabajo se describen dos nuevas variantes identificadas en un paciente con deficiencia en la enzima PTPS, una variante intrónica interna (c.164-672C>T) y otra que afecta al sitio 5' de *splicing* del exón 4 (c.243+3A>G).

1.1. Estudio del perfil transcripcional en fibroblastos de un paciente con deficiencia en PTPS

El paciente fue detectado por cribado neonatal debido a los altos niveles de fenilalanina (226 μ M; valor de referencia <120 μ M). El análisis genético en el laboratorio por secuenciación masiva permitió identificar una variante en el gen *PTS*: c.243+3A>G, que afecta al sitio 5' de *splicing* del exón 4 (disminuye su valor de 83,99 a 82,83 según el programa HSF). Subsecuentemente la secuenciación por *Sanger* de una región del intrón 2 con pseudoexones previamente identificados (Brasil et al. 2011) permitió identificar la segunda variante, c.164-672C>T, también nueva, que crea un potencial sitio 5' de *splicing* según el programa HSF con un valor de 75,85.

El análisis por RT-PCR de los transcritos del gen *PTS* en los fibroblastos del paciente mostró varias bandas de distintos pesos moleculares, además de la banda correspondiente al *splicing* normal (**Fig. 5A**). Tras subclonar y secuenciar, se comprobó que las bandas de bajo peso molecular se correspondían con el *skipping* del exón 3 (que se da de forma natural en pequeña proporción (Liu et al. 2001)), *skipping* del exón 4 y *skipping* de los exones 3 y 4. En muestras de fibroblastos tratados con puromicina se observaron bandas de mayor peso molecular, que se correspondían con la inserción de secuencias intrónicas (pseudoexones) de 45, 70, 93 y 118 pb entre los exones 2 y 3. Las dos primeras inserciones se corresponden con pseudoexones previamente descritos que pueden ser activados por diferentes mutaciones (Brasil et al. 2011), y las dos últimas se corresponden con el uso del nuevo sitio 5' de *splicing* en combinación con diferentes sitios 3' crípticos de *splicing* (**Fig. 5B**).

A)



B)

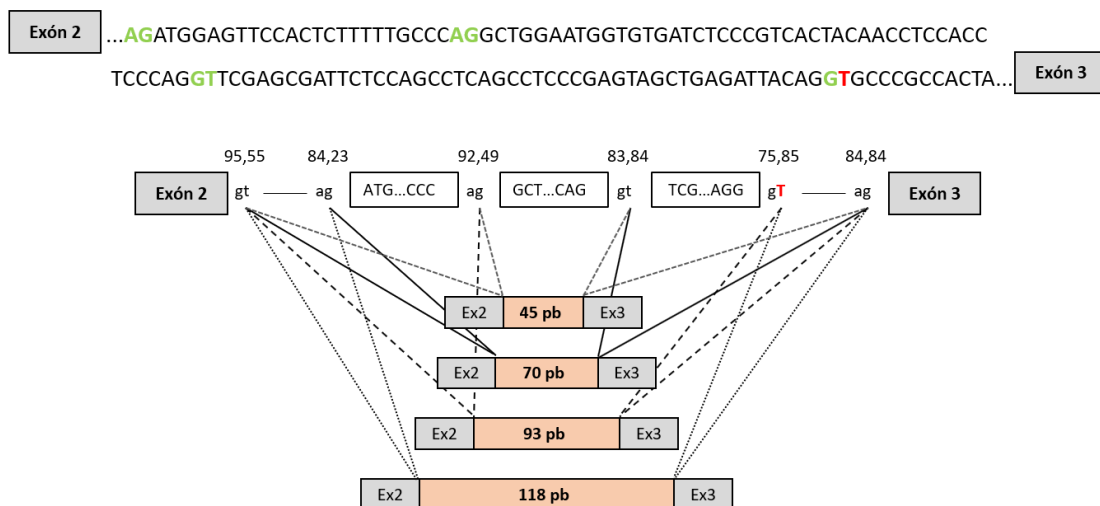


Figura 5. Perfil transcripcional del gen *PTS* en los fibroblastos del paciente con deficiencia en *PTPS*. A) Análisis por RT-PCR de los fibroblastos del paciente antes y después del tratamiento con puromicina (4 µg/mL) durante 5 h. La posterior clonación y secuenciación permitió identificar todos los transcritos obtenidos, cuyo esquema se muestra a la derecha. Las bandas de mayor peso molecular se corresponden con la inserción de pseudoexones de 45, 70, 93 y 118 pb y las de menor peso molecular se corresponden con el *skipping* de diferentes exones. B) En el panel superior se muestran los sitios 3' y 5' crípticos de *splicing* usados para la inclusión de los diferentes pseudoexones detectados en el intrón 2 (en verde los nucleótidos consenso AG y GT, y en rojo la mutación c.164-672C>T), junto a un esquema representativo de los diferentes pseudoexones identificados. Los valores de los sitios de *splicing* fueron estimados usando el programa HSF (<http://www.umd.be/HSF3/HSF.shtml>).

1.2. Análisis funcional de las nuevas variantes mediante minigenes

El efecto individual de cada una de las variantes fue estudiado usando un sistema de minigenes y transfección en células Hep3B. La variante c.164-672C>T fue analizada en el minigen pCR3.1 ex2-4 ya descrito que incluye las secuencias genómicas del exón 2 al exón 4 (Brasil et al. 2011) (Fig. 6A). Esta variante conduce, además de a una banda correspondiente al *splicing* normal, a la inclusión de 70, 93 o 118 pb del intrón 2, pseudoexones previamente identificados en los fibroblastos del paciente (Fig. 6B). La variante c.243+3A>G fue analizada en un minigen con el exón 4 y las secuencias intrónicas flanqueantes clonadas en el vector pSPL3 (minigen pSPL3 ex4) (Fig. 6D). Como se muestra en la Figura 6E la variante c.243+3A>G causa el *skipping* del exón 4, consistente con la disminución del valor del sitio 5' donador de *splicing* según las predicciones bioinformáticas.

El efecto en el patrón de *splicing* de ambas variantes también fue analizado en células de neuroblastoma SH-SY5Y después de la transfección de los correspondientes minigenes, para investigar si había alguna diferencia específica de tejido en el patrón de *splicing*. Los resultados mostraron un patrón muy similar a excepción de la variante c.243+3A>G que presentaba un *skipping* parcial del exón 4 (Fig. 6C y 6F).

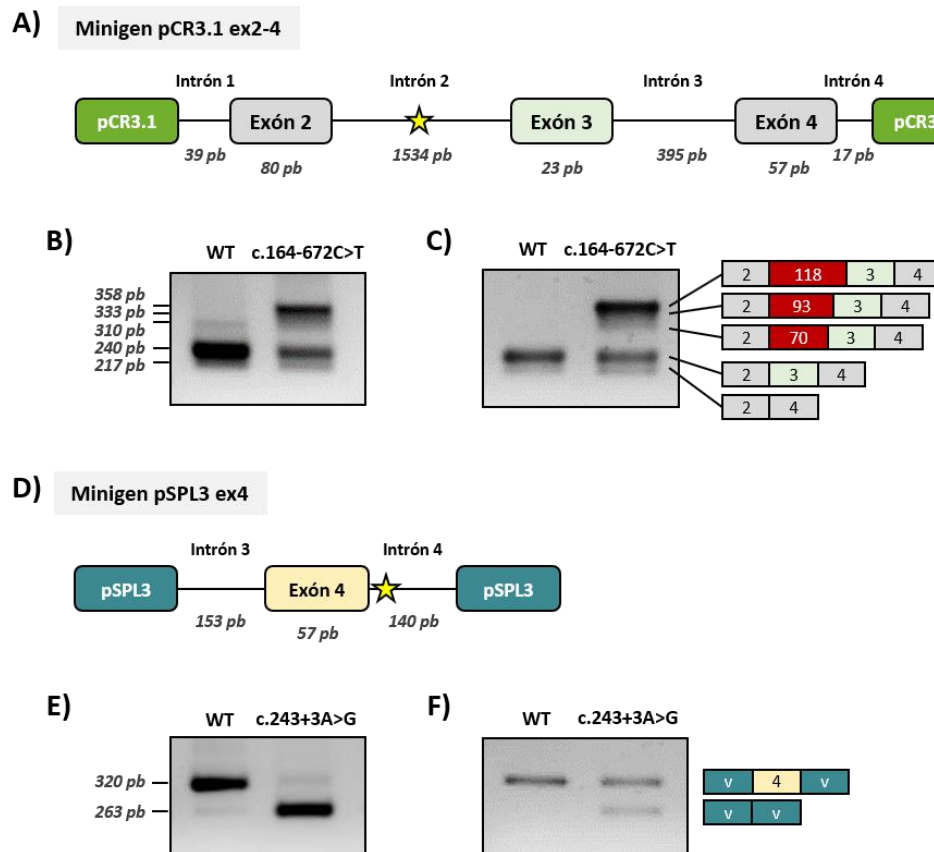


Figura 6. Caracterización del efecto causado por las variantes c.164-672C>T y c.243+3A>G mediante el uso de minigenes. **A)** Construcción esquemática del minigen pCR3.1 ex2-4 junto con el perfil de RT-PCR en las células Hep3B **(B)** o en células de neuroblastoma SH-SY5Y **(C)** después de la transfección con los minigenes *wild-type* (wt) y mutante. **D)** Esquema de la construcción del minigen pSPL3 ex4 y análisis del perfil transcripcional en las células Hep3B **(E)** y en células de neuroblastoma SH-SY5Y **(F)**. A la derecha de cada gel se muestra un dibujo esquemático de la identidad de las bandas confirmada por secuenciación. V: secuencias del vector.

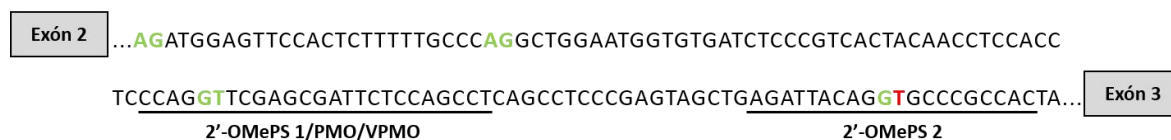
3.3. Exclusión de pseudoexones con AONs

Viendo el éxito de la terapia antisentido en otras enfermedades para rescatar los defectos de *splicing* (Havens and Hastings 2016), quisimos emplear diferentes tipos de AONs con el fin de suprimir la activación de los pseudoexones causada por la variante c.164-672C>T. Los AONs se encuentran modificados químicamente para evitar su degradación y aumentar su estabilidad *in vivo*, así como su afinidad de unión a la secuencia diana (Kole et al. 2012). Se diseñaron dos AONs

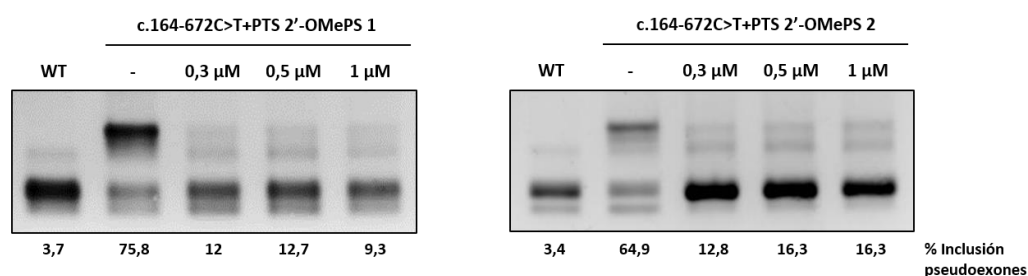
de tipo 2'-OMePS cada uno dirigido a una región del pre-mRNA. El 2'-OMePS 1 hibridaba con la secuencia en la cual los 3 pseudoexones convergen y el 2'-OMePS 2 estaba dirigido al nuevo sitio 5' de *splicing* creado por la mutación (**Fig. 7A**). Ambos oligonucleótidos fueron transfectados a diferentes concentraciones (0,3, 0,5 y 1 μ M) en células Hep3B, previamente transfectadas con el minigen pCR3.1 ex2-4 mutante, analizándose el perfil transcripcional del minigen 24 h después de la transfección con los AONs. El resultado representado en la **Figura 7B** muestra una reducción parcial de las bandas de pseudoexones independientemente de la dosis empleada y el 2'-OMePS usado. Las bandas de PCR correspondientes a la inclusión de pseudoexones observadas después de la transfección con los 2'-OMePS fueron clonadas y secuenciadas y, en ambos casos se vio una reducción mayoritaria de la inclusión del pseudoexon de 93 pb.

Además, se emplearon oligonucleótidos de tipo PMO, incluyendo también un VPMO. Ambos presentan la misma secuencia que el oligonucleótido 2'-OMePS 1 (**Fig. 7A**) y fueron usados anteriormente para la corrección de la inclusión aberrante de pseudoexones causada por otra mutación localizada en la misma región (Brasil et al. 2011). El tratamiento con el PMO y VPMO fue realizado usando concentraciones de 10, 20 y 30 μ M en células Hep3B previamente transfectadas con el minigen pCR3.1 ex2-4 mutante. El resultado mostrado en la **Figura 7C** reveló un patrón de *splicing* similar al visto con los oligonucleótidos 2'-OMePS, donde la inclusión de los pseudoexones se vio disminuida.

A)



B)



C)

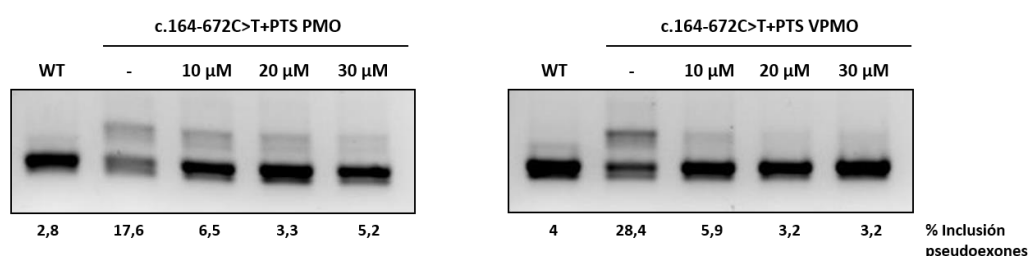


Figura 7. Efecto de diferentes AONs sobre la inserción de pseudoexones generados por la variante c.164-672C>T.

A) Representación esquemática del sitio de hibridación de los distintos AONs en la región de los pseudoexones en el pre-mRNA. El cambio c.164-672C>T aparece destacado en rojo y en verde los sitios donadores y aceptores de *splicing* que definen los pseudoexones. **B)** Los geles muestran el análisis por RT-PCR del efecto de los 2'-OMePS 1 y 2 en las células transfectadas con el minigen pCR3.1 ex2-4 mutado, en comparación con el minigen *wild-type* (wt). **C)** Análisis por RT-PCR del efecto del PMO y VPMO en las células transfectadas con el minigen pCR3.1 ex2-4 mutado, comparado con el minigen wt. El porcentaje de inclusión de pseudoexones se muestra bajo cada carril.

A continuación, se analizó el efecto de los AONs en los fibroblastos del paciente, para lo cual se transfectaron los 2'-OMePS 1 y 2, además de un 2'-OMePS de secuencia aleatoria como control negativo (*Scrambled*) a una concentración final de 0,5 μ M, y se estudió el perfil transcripcional tras 48 h. Los resultados de la RT-PCR mostraron una disminución de la inclusión de los pseudoexones (**Fig. 8A**). Asimismo, los fibroblastos fueron transfectados con el VPMO a 15 μ M y 48 h después del tratamiento, los resultados del estudio del perfil transcripcional mostraron resultados similares (**Fig. 8B**).

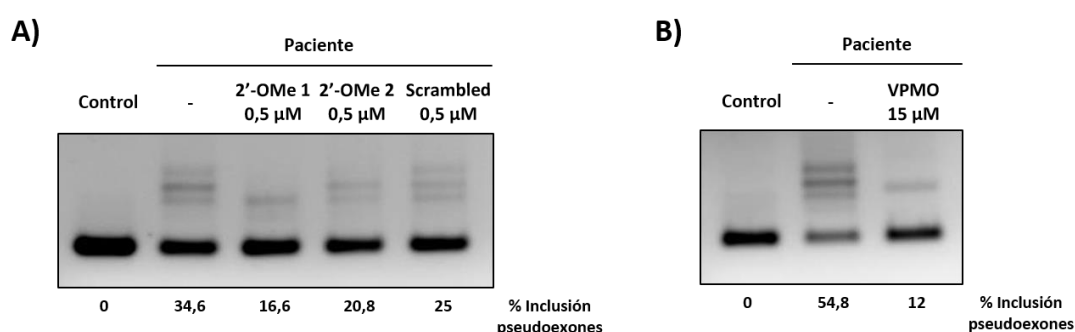


Figura 8. Efecto de diferentes AONs sobre la inserción de pseudoexones en los fibroblastos del paciente. Análisis por RT-PCR del gen *PTS* en los fibroblastos del paciente tras la transfección de los AONs de tipo 2'-OMePS y un *Scrambled* control a 0,5 μ M (**A**) o de tipo VPMO a 15 μ M (**B**). El porcentaje de inclusión de pseudoexones se muestra bajo cada carril. Control: fibroblastos de un individuo sano.

3.4. Corrección del *exon skipping* por sobreexpresión de un U1 snRNA adaptado

El primer paso en regulación del *splicing* es el reconocimiento del sitio de *splicing* por U1 snRNP a través de la unión del extremo 5' del U1 snRNA al sitio 5' de *splicing* del pre-mRNA (Keren et al. 2010). Está descrito que al aumentar la complementariedad entre ambas secuencias puede favorecerse el reconocimiento del sitio 5' de *splicing* y con ello la inclusión exónica (Fernandez Alanis et al. 2012), lo que se está utilizando como estrategia terapéutica. Dado que la variante c.243+3A>G afecta al sitio 5' de *splicing* del exón 4, quisimos ensayar la sobreexpresión de un U1 snRNA adaptado completamente complementario a la secuencia mutante (**Fig. 9A**). El ensayo de co-transfección con los minigenes pSPL3 ex4 wt y mutante y las diferentes construcciones de U1

snRNA en células Hep3B fue analizado mediante RT-PCR. Los resultados muestran una completa reversión del defecto de *splicing* en el minigen mutante con el U1 snRNA modificado (**Fig. 9B**).

Asimismo, los fibroblastos del paciente fueron transfectados con diferentes cantidades (0,5, 1, 2 y 4 μ g) del plásmido que codifica para el U1 snRNA adaptado para ser perfectamente complementario al sitio 5' de *splicing* mutante del exón 4. Tras el análisis mediante RT-PCR del gen *PTS* de los fibroblastos no se observó ninguna alteración del perfil transcripcional (**Fig. 9C**). Al contrario que en los minigenes, los estudios preliminares utilizando el U1 snRNA adaptado, no han permitido corregir el defecto de *splicing* de la mutación c.243+3A>G, siendo necesario optimizar esta estrategia terapéutica en los fibroblastos.

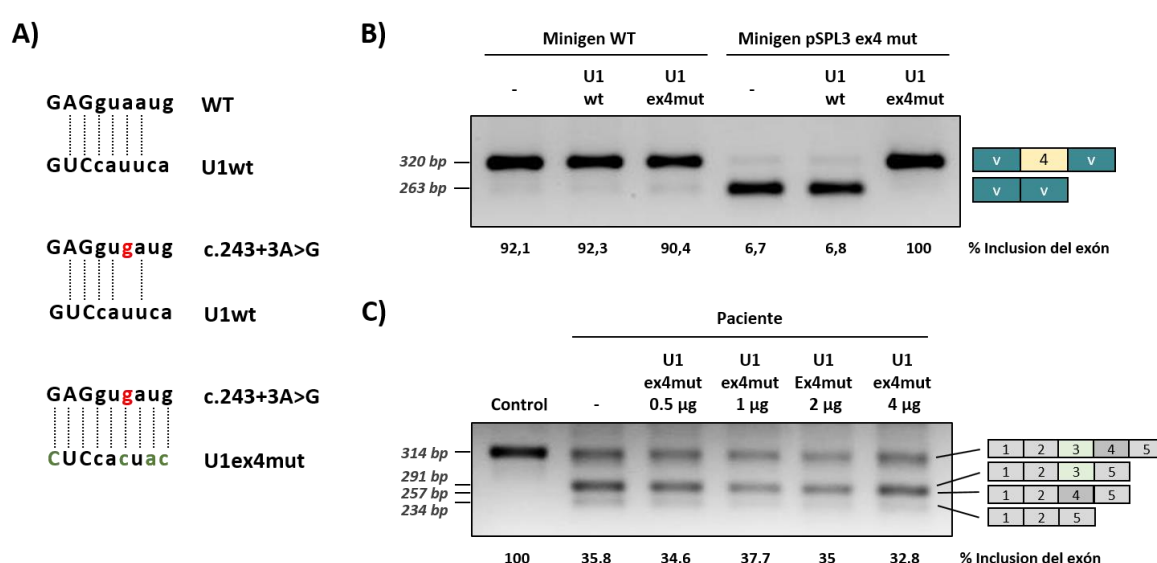


Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de un U1 snRNA adaptado sobre el *splicing* aberrante debido a la variante c.243+3A>G. **A)** Representación esquemática de la complementariedad de bases entre el sitio 5' donador de *splicing* del exón 4 del gen *PTS* *wild-type* (wt) y mutante, y las diferentes construcciones de U1 snRNA. En rojo se muestra la mutación y en verde los oligonucleótidos cambiados para una perfecta complementariedad de bases entre la secuencia mutante y el U1 snRNA. **B)** Análisis por RT-PCR tras la co-transfección de los minigenes pSPL3 ex4 wt y mutante con las diferentes construcciones de U1 snRNA. **C)** Análisis por RT-PCR tras la transfección de los fibroblastos del paciente con cantidades diferentes (0,5, 1, 2 y 4 μ g) de la construcción U1ex4mut. A la derecha de cada gel se muestra un dibujo esquemático de la identidad de las bandas. El porcentaje de inclusión del exón es mostrado bajo cada carril. V: secuencias del vector. Control: fibroblastos de un individuo sano.

2. Uso de miMCs como estrategia de vehiculización de AONs

El principal problema de la aplicación *in vivo* de la terapia antisentido con AONs es el uso de una estrategia de vehiculización (*delivery*) eficiente (Godfrey et al. 2017). En distrofia muscular de Duchenne se han utilizado con éxito vectores virales codificantes para el U7 snRNA (que permite el direccionamiento al núcleo) fusionado con la secuencia de un AON específico (Goyenvallé et al. 2004). Sin embargo, estos vectores virales poseen todas las desventajas de la terapia génica. Como alternativa a los vectores virales, se han desarrollado vectores plasmídicos no virales eficaces en terapia génica, en concreto los minicírculos (MCs), compuestos solamente de secuencias eucariotas, con objeto de aumentar la seguridad y la eficiencia. Recientemente se ha utilizado un MC codificante para el U7 snRNA fusionado a un AON, resultando en vectores de unas 650 pb (**micro-minicírculos o miMCs**) que permiten bloquear eficientemente sitios de *splicing* resultando en *skipping* de un exón tras la administración mediante inyección hidrodinámica en modelos murinos (Stenler, Wiklander, et al. 2014).

El objetivo en esta segunda sección fue estudiar la eficacia de la modulación del *splicing* en el gen *PAH* utilizando miMCs. Para ello, se usó un plásmido parental portador de un *cassette* de expresión con U7 snRNA optimizado fusionado a un AON utilizado previamente para forzar la exclusión del exón 11 del gen *PAH* (Gallego-Villar et al. 2014).

2.1. Producción de los miMCs

Como plásmido parental se utilizó el “U7smOpt-asLuc705”, que presenta un *cassette* de expresión para U7SmOpt snRNA fusionado a una secuencia antisentido moduladora de *splicing* (asLuc705), dirigida al gen mutante de la luciferasa. El U7 snRNA normalmente está implicado en el procesamiento del pre-mRNA de las histonas, pero está modificado de tal manera que facilita el direccionamiento hacia el núcleo dejando de ejercer su función habitual y permitiendo ser usado como vehículo para las secuencias antisentido (Goyenvallé et al. 2004). Sobre dicho plásmido se eliminó por mutagénesis la secuencia antisentido dirigida al gen de la luciferasa, para clonar nuestra secuencia antisentido de interés complementaria al sitio 5' de *splicing* del exón 11 del gen *PAH* (**Fig. 10**).

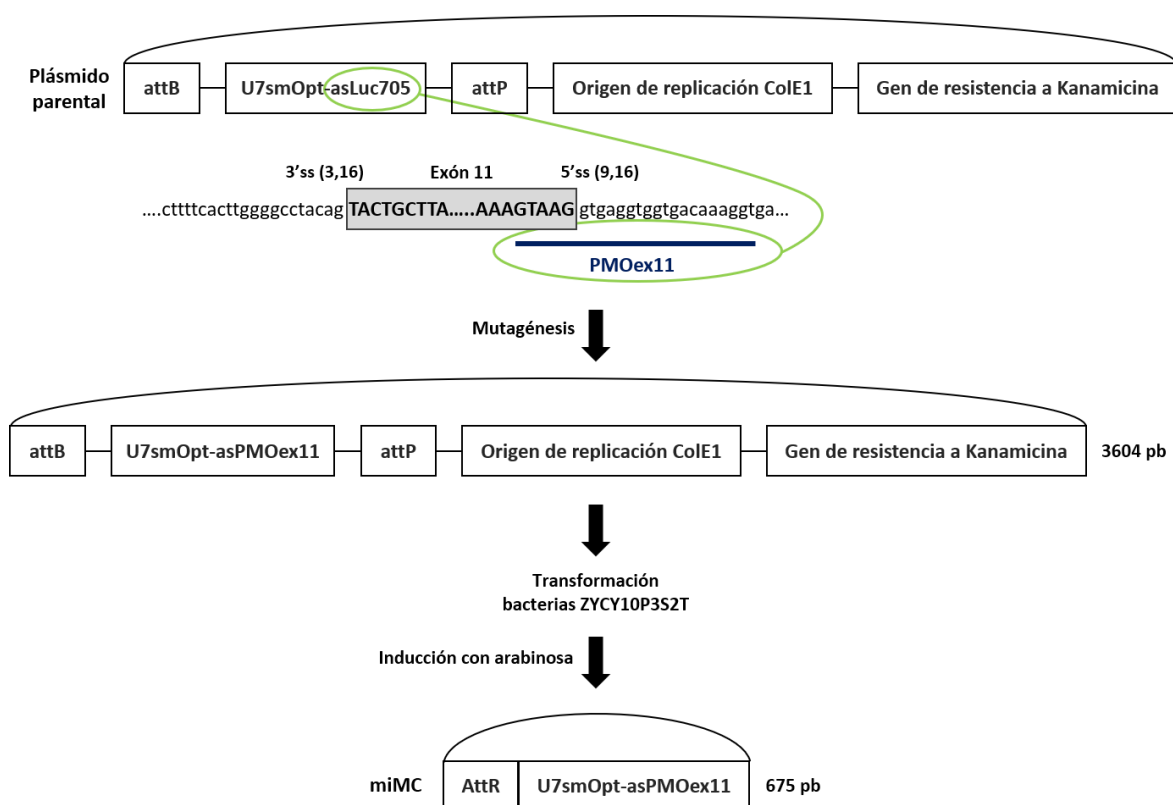


Figura 10. Esquema representativo de la producción de miMCs a partir del plásmido parental. En el panel superior se muestra el plásmido parental U7smOpt-asLuc705, portador de un *cassette* de expresión para U7SmOpt snRNA fusionado a una secuencia antisentido, dirigida al gen mutante de la luciferasa (asLuc705). Dicha secuencia antisentido es sustituida por la secuencia antisentido PMOex11 dirigida al sitio 5' de *splicing* del exón 11 del gen *PAH* mediante mutagénesis. Tras la transformación de bacterias ZCY10P3S2T y posterior inducción con arabinosa se generan los miMCs de unas 675 pb. AttR: el producto de recombinación de attB/AttP por la integrasa Φ C31. Figura adaptada de (Stenler, Wiklander, et al. 2014).

Para la producción de los miMCs se empleó una cepa específica de *E.coli* (ZCY10P3S2T), que contiene los genes que codifican para integrasas y endonucleasas (necesarias para la formación de los miMCs) bajo el promotor pBAD inducible por arabinosa. Se transformaron las bacterias con el plásmido parental que contiene nuestra secuencia de interés, los sitios de recombinación attB y attP y el gen de resistencia a kanamicina y, a partir de las colonias, se generaron los miMCs según se describe en materiales y métodos (**Fig. 10**). Durante la inducción y producción de los miMCs es frecuente que tenga lugar la formación de dímeros, trímeros o tetrámeros, pero la mayoría de los eventos de recombinación resultan en la forma monomérica de los miMCs (**Fig. 11**). Esta inducción se llevó a cabo usando el plásmido parental portador de nuestra secuencia de interés, así como el plásmido parental sin ella, que fue usado como control.

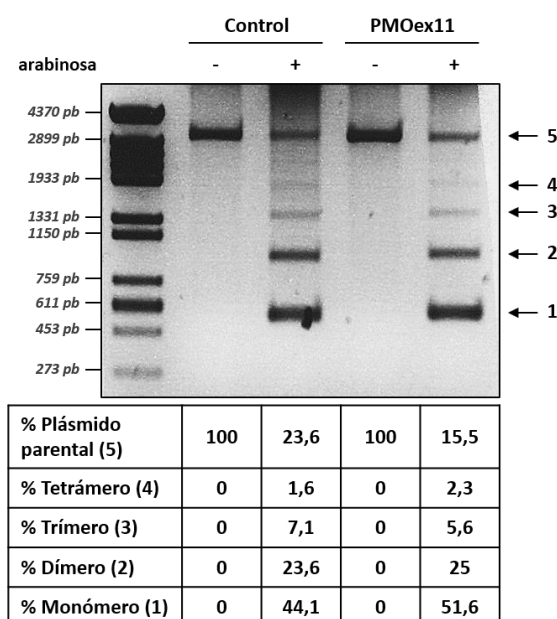


Figura 11. Producción de miMCs. Análisis en gel de agarosa del DNA plasmídico de las bacterias ZYCY10P3S2T antes y después de la inducción de miMCs, transformadas con el plásmido parental portador de la secuencia de interés PMOex11 y con el plásmido control que carece de ella. En la tabla inferior se muestran los porcentajes estimados por densitometría de las bandas correspondientes al plásmido parental y a los concatémicos tras la inducción de los miMCs. Monómero (1), dímero (2), trímero (3), tetrámero (4) y plásmido parental (5).

2.2. Uso de los miMCs para la inducción del *skipping* del exón 11 del gen *PAH*

Con los miMCs generados y la fracción monomérica purificada, se procedió al estudio *in vitro* de la eficiencia de los mismos en la modulación del *splicing*, teniendo como objetivo forzar el *skipping* del exón 11 del gen *PAH*. Para ello, las células Hep3B fueron transfectadas con el plásmido parental, con el DNA aislado tras la inducción y con la forma monomérica purificada, portando la secuencia de interés PMOex11 (dirigida al sitio 5' de *splicing* del exón 11 de la *PAH*, **Fig. 10**), y controles que carecen de ella. Se compararon diferentes cantidades de DNA (1, 2, 3 y 4 µg) y diferentes tiempos de recogida de las células (48 y 72 h). Los análisis por RT-PCR revelaron un *skipping* parcial del exón 11 obteniendo los mejores resultados con la fracción monomérica de los miMCs, independientemente de la cantidad de DNA administrada y del tiempo de recogida de las células (**Fig. 12**).

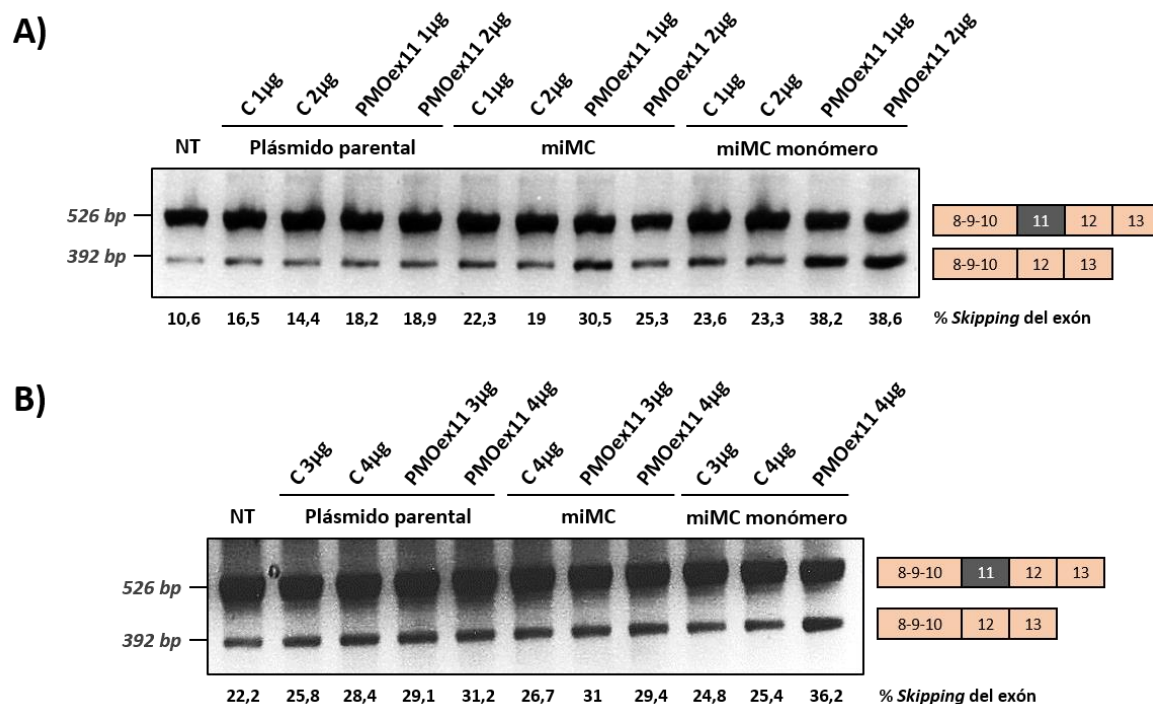


Figura 12. Efecto de los miMCs sobre el *splicing* del gen *PAH* en células Hep3B. Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional del gen *PAH* de las células Hep3B 48 h tras la transfección con 1, 2 µg **(A)** o con 3, 4 µg **(B)**, con el plásmido parental de los miMCs, con el DNA total aislado tras la inducción o con la forma monomérica, con la secuencia de interés PMOex11 o sin ella (C, control). La identidad de las bandas se muestra en forma de esquema a la derecha de cada gel. Bajo cada carril se muestra el porcentaje de *skipping* del exón 11 de la *PAH*. NT: no

3. Identificación y análisis de variantes intrónicas profundas en el gen *PAH*

La secuenciación del exoma completo (WES) se está convirtiendo en un enfoque cada vez más rutinario en el diagnóstico de las enfermedades mendelianas. A pesar de su éxito, el 50-75% de los pacientes no reciben un diagnóstico genético por WES, lo que indica que las variantes causantes de enfermedad pueden localizarse en regiones no codificantes (Kremer et al. 2017). La secuenciación de transcriptomas (*RNA-seq*) permitiría identificar las posibles variantes que alteran el *splicing* tanto en las regiones exónicas como en las regiones intrónicas profundas (Cummings et al. 2017). Sin embargo, son muchos los casos en los que se carece de células del paciente donde se expresa el gen, como ocurre con el gen *PAH* que solo se expresa en hígado. En estos casos la secuenciación masiva de genes completos ha permitido la identificación de un número creciente de variantes ubicadas en las regiones intrónicas internas. De hecho, se han identificado variantes de un solo cambio nucleotídico (SNVs) en regiones intrónicas profundas con una asociación significativa a enfermedades hereditarias (Xiong et al. 2015; Hsiao et al. 2016). Las variantes ubicadas a más de 100 pares de bases lejos de las uniones exón-intrón generalmente conducen a la inclusión de pseudoexones debido a la activación de sitios de *splicing* no canónicos o cambios en los elementos reguladores del *splicing* (Vaz-Drago et al. 2017).

En este apartado se analizaron 7 pacientes con HFA en los que se había identificado una sola mutación patogénica en la región exónica o intrónica flanqueante del gen *PAH*, con el objetivo de identificar la segunda variante patogénica.

3.1. Identificación y selección de variantes intrónicas profundas

Para la identificación de variantes en regiones intrónicas en muestras de DNA de 7 pacientes (P1 a P7) se utilizó un panel personalizado diseñado en el laboratorio (TES, *Targeted Exome Sequencing*) que permite la captura del exoma completo de 121 genes causantes de enfermedades metabólicas hereditarias, y en algunos casos la captura del gen completo, como ocurre con el gen *PAH*. Los pacientes presentaban niveles de fenilalanina $>120 \mu\text{mol/L}$, con una mutación patogénica ya descrita. Las variantes encontradas en cada paciente fueron filtradas y priorizadas mediante el programa *VariantStudio Data Analysis Software* (Fig. 13). En este estudio se excluyeron las variantes que estaban en homocigosis, y las pequeñas deleciones e inserciones para reducir el número de variantes y facilitar la búsqueda. El resto de las variantes fueron priorizadas por su ausencia en la base de datos de gnomAD o su presencia, pero con una frecuencia alélica $<0,01$, así como su ausencia en la propia base de datos del laboratorio (Tabla 11).

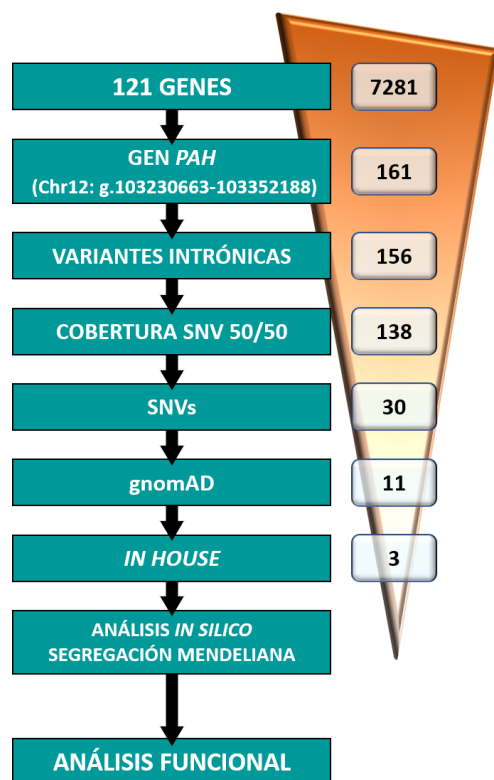


Figura 13. Sistema de trabajo empleado para la selección de las variantes intrónicas internas en el gen *PAH* tras un análisis de TES. Priorización de las variantes mediante la aplicación de diferentes filtros para un posterior análisis bioinformático de las variantes seleccionadas, confirmación de la segregación mendeliana en las muestras de los padres, y análisis funcional. Los valores que se muestran a la derecha representan una media del número de variantes encontradas en los 7 pacientes después de aplicar cada uno de los filtros.

Una vez seleccionadas las posibles variantes candidatas, se realizó un estudio *in silico* utilizando los programas HSF y ESEfinder como herramienta bioinformática para determinar si las variantes seleccionadas podrían tener un efecto sobre el mecanismo de *splicing*. El análisis reveló que todas ellas, activando o eliminando un sitio 3' o 5' crítico de *splicing*, o sitios de unión a elementos reguladores, podrían alterar el procesamiento del pre-mRNA. Estas variantes candidatas se confirmaron en los pacientes mediante secuenciación convencional por *Sanger*, así como también en muestras de DNA de los padres. De las 5 variantes candidatas 4 de ellas estaban en *trans* con la mutación ya descrita a excepción de la variante c.706+602G>C (P6) que no se encontró en ninguno de los padres, con lo que podría tratarse de una mutación *de novo* (Tabla 12).

Son varios los ejemplos donde mutaciones localizadas en regiones intrónicas internas, y en particular en secuencias LINE o SINE, inducen la activación de pseudoexones (Brasil et al. 2011). El análisis de dichas secuencias en el gen *PAH* reveló que las variantes c.706+519T>C (P2) y c.706+602G>C (P6) se encontraban incluidas dentro de una secuencia SINE y la variante c.169-1594T>C (P4) estaba presente en una secuencia LINE.

Tabla 11. Variantes intrónicas encontradas en los datos de NGS de 7 pacientes con HFA después de aplicar los filtros correspondientes.

Paciente	Mutación descrita	SNV encontrado *	Intrón	Cobertura (alelo ref/alelo mut)	gnomAD (MAF<0,01)	In house (n=347)	Observaciones
P1	c.1066-11G>A	c.441+4570G>A (g.103266670)	4	227 (114/113)	SI (0,0057)	2	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
		c.168+6805T>C (g.103299764)	2	181 (68/113)	SI (0,0058)	2	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
P2	c.913-7A>G	c.1316-336C>A (g.103233332)	12	349 (178/171)	SI (0,00029)	2	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
		c.1200-1019C>T (g.103235312)	11	205 (127/77)	SI (0,0042)	5	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
		c.706+519T>C (g.103248395)	6	315 (160/154)	NO	0	Seguir en estudio
		c.510-4529T>C (g.103253639)	5	8 (6/2)	NO	0	Descartada por baja cobertura
P3	c.527G>C	c.441+683C>G (g.103270557)	4	250 (191/58)	NO	93	Descartada por alta frecuencia <i>in house</i>
		c.353-1176C>T (g.103272504)	3	452 (254/197)	SI (0,0015)	8	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
P4	c.143T>C	c.441+683C>G (g.103270557)	4	306 (221/81)	NO	93	Descartada por alta frecuencia <i>in house</i>
		c.353-5696T>C (g.103277024)	3	885 (478/407)	NO	0	Seguir en estudio
		c.352+3964T>C (g.103284549)	3	600 (319/281)	SI (0,0016)	5	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
		c.169-1594T>C (g.103290290)	2	767 (387/379)	NO	0	Seguir en estudio
P5	c.592_613del22	c.1200-1019C>T (g.103235312)	11	330 (178/152)	SI (0,0042)	5	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
		c.706+639G>T (g.103248275)	6	391 (228/163)	NO	0	Seguir en estudio
		c.441+683C>G (g.103270557)	4	186 (148/38)	NO	93	Descartada por alta frecuencia <i>in house</i>
		c.61-1784A>G (g.103308460)	1	388 (190/197)	SI (0,000032)	3	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
P6	c.898G>T	c.706+602G>C (g.103248312)	6	505 (288/216)	NO	0	Seguir en estudio
		c.510-3337A>G (g.103252447)	5	8 (6/2)	NO	0	Descartada por baja cobertura
		c.353-1176C>T (g.103272504)	3	351 (180/171)	SI (0,0015)	7	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
		c.169-6212A>G (g.103294908)	2	240 (124/115)	SI (0,0019)	11	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
P7	c.194T>C	c.509+2998T>A (g.103257376)	5	631 (337/294)	SI (0,0074)	10	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones
		c.168+7339C>T (g.103299230)	2	287 (139/148)	SI (0,0032)	8	Descartada. La porta al menos un PKU que ya tiene descritas las dos mutaciones

*NM_000277/GRCh37

El conjunto de estos resultados sugiere la posible activación de pseudoexones como consecuencia de dichas variantes. Sin embargo, fue imprescindible llevar a cabo una verificación experimental mediante la construcción de minigenes, al ser inviable la obtención de células hepáticas de los pacientes.

Tabla 11. Análisis bioinformático y segregación mendeliana de las variantes intrónicas candidatas.

Paciente	Alelo materno	Alelo paterno *	Intrón	HSF y ESEfinder
P2	c.913-7A>G	c.706+519T>C (g.103248395)	6	Activación sitio 3' acceptor Creación de dos sitios ISE Pérdida de un ISS
P4	c.143T>C	c.353-5696T>C (g.103277024)	3	Pérdida de un sitio ISE y creación de dos Pérdida de tres sitios ISS
		c.169-1594T>C (g.103290290)	2	Creación de tres sitios ISE Pérdida de dos sitios ISS
P5	c.592_613del22	c.706+639G>T (g.103248275)	6	Activación sitio 3' acceptor Aumenta el valor de dos sitios de unión ISE Pérdida de dos sitios ISS
P6	c.898G>T	c.706+602G>C (g.103248312) <i>De novo</i>	6	Activación sitio 3' acceptor Creación de cuatro sitios ISE Pérdida de un ISS

*NM_000277/GRCh37

3.2. Análisis funcional de las variantes intrónicas profundas por minigenes

El ensayo de minigenes se realizó con las cinco variantes finalmente seleccionadas localizadas en el intrón 2 (c.169-1594T>C), en el intrón 3 (c.353-5696T>C) y en el intrón 6 (c.706+519T>C, c.706+602G>C y c.706+639G>T). La construcción de los minigenes fue diseñada para incluir todos los posibles sitios críticos de *splicing* aceptores y donadores con un mínimo de 200 pb flanqueando la mutación (**Fig. 14A**). Para determinar si alguna de estas variantes producía un *splicing* aberrante las células COS7 fueron transfectadas con los minigenes generados con la correspondiente región wt y mutante. El análisis por RT-PCR utilizando cebadores específicos del vector reveló que ninguna de las variantes parecía producir la inclusión de pseudoexones (**Fig. 14B**).

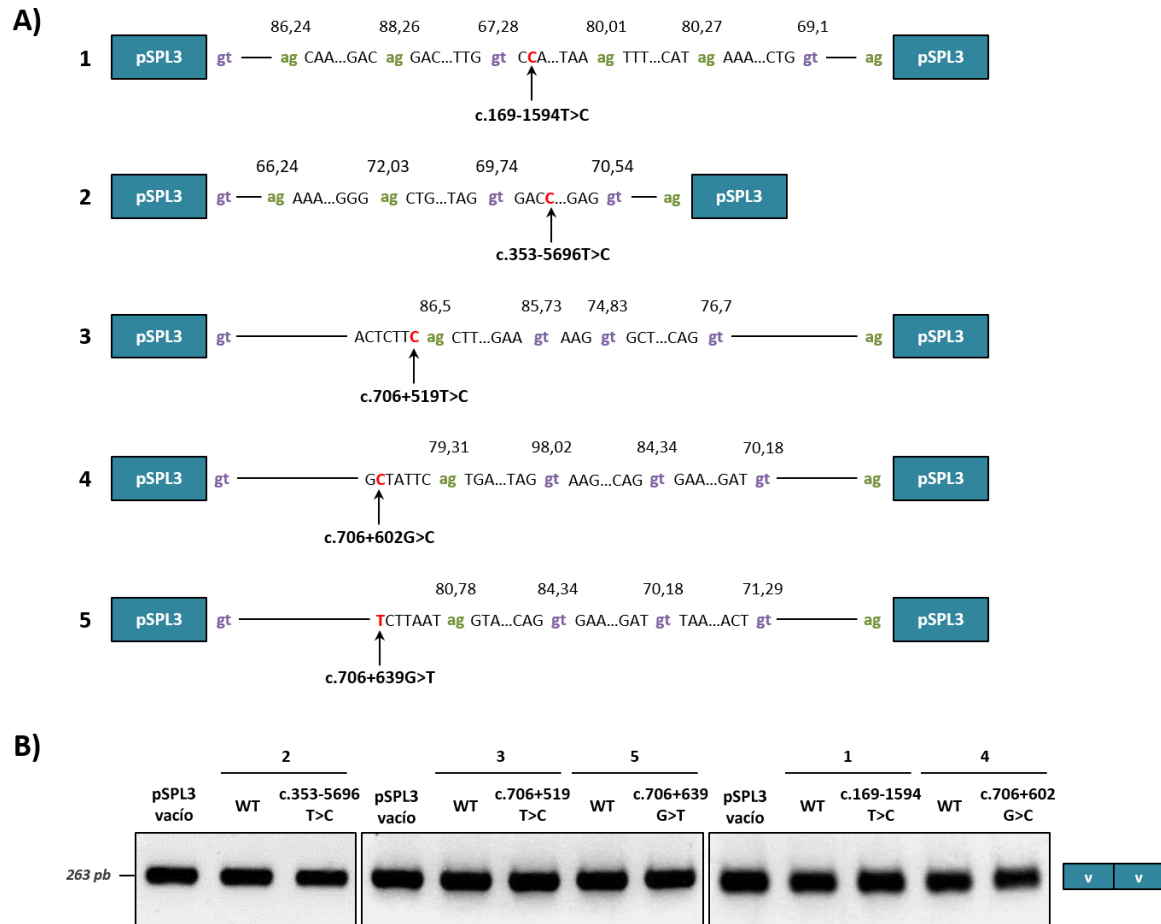


Figura 14. Análisis del efecto causado por las variantes candidatas mediante el uso de minigenes. A) Construcción esquemática de los minigenes en pSPL3 con los posibles sitios 3' aceptores (en verde) y 5' donadores (en morado) crípticos de *splicing* que pueden ser usados para la inclusión de pseudoexones en el intrón 2 con 1483 pb clonadas (1), en el intrón 3 con 498 pb (2) o en el intrón 6 con 1437 pb (3, 4 y 5), y en rojo se muestra la mutación. Los valores de los sitios de *splicing* fueron estimados usando el programa HSF. **B)** Perfil transcripcional de las células COS7 después de la transfección con los minigenes *wild-type* (wt) y mutantes según las construcciones mostradas en el panel superior. A la derecha del gel se muestra un dibujo esquemático de la identidad de las bandas confirmada por secuenciación. V: secuencias del vector.

4. Análisis funcional de mutaciones de *splicing* en el gen *PAH*

En esta última parte del trabajo se describe el estudio funcional de dos mutaciones intrónicas, c.1199+17G>A y c.1199+20G>C, detectadas en el gen *PAH* en pacientes HFA.

4.1. Identificación de mutaciones y predicción *in silico* de su efecto

La variante c.1199+17G>A ha sido previamente descrita (Acosta et al. 2001) y fue detectada en heterocigosis en 3 pacientes HFA remitidos al laboratorio de diagnóstico CEDEM. La variante c.1199+20G>C, localizada en la misma región, fue identificada en un paciente de USA (Guldborg et al. 1996). Ambas variantes están descritas en la base de datos dbSNP, sin MAF asociado ni indicación de significancia clínica. Además, ninguna de ellas está presente en la base de datos gnomAD.

El posible efecto patogénico de las dos variantes intrónicas en el proceso de *splicing* fue examinado usando varios predictores informáticos como el ESEfinder y HSF. Para la variante c.1199+17G>A se observó la eliminación de los sitios de unión a SRSF1 y SRSF7, creando un nuevo sitio para Tra2β y, eliminando dos sitios y creando a la vez un sitio de unión para hnRNP A1. Para la variante c.1199+20G>C solo se detectó la pérdida de un sitio para SRSF7 (Tabla 13).

Tabla 13. Sitios de unión de los factores de *splicing* a la región intrónica del gen *PAH* en torno a las variantes c.1199+17G>A y c.1199+20G>C. Se muestran los efectos de las variantes y de las delecciones introducidas en los minigenes. WT; *wild-type*. Los predictores usados fueron ESEfinder y HSF.

	SRSF1	SRSF1 IgM- BRCA1	SRSF2	SRSF5	SRSF7	TRA2β	hnRNP A1
WT	+	+	+	+	+	+	-
+17G>A	-	-	+	+	↓	+	-
+20G>C	+	+	+	+	+	-	↑
+13del7	-	-	+	+	+	-	-
+17del6	-	↓	+	+	-	-	-
+20del5	+	+	-	+	↓	+	+

El signo (+) señala la presencia y el signo (-) indica ausencia o pérdida del sitio de unión de un factor de *splicing*. La flecha hacia abajo (↓) indica una disminución de la fuerza de unión de un factor de *splicing* y la flecha hacia arriba (↑) indica un aumento.

4.2. Análisis funcional mediante el uso de minigenes

El análisis funcional de c.1199+17G>A y c.1199+20G>C se realizó usando dos construcciones diferentes de minigenes. Como se muestra en la **Figura 15** las variantes +17a y +20c resultan en un grado variable de *skipping* del exón 11 del gen *PAH*, confirmando que su naturaleza patogénica es causada por un defecto de *splicing*. En los minigenes wt se observó una banda residual de *skipping* del exón 11. Esto se debe a la naturaleza débil del sitio 3' de *splicing* de dicho exón, como se ha descrito previamente (Heintz et al. 2012). Además, el sitio 5' de *splicing* presenta una secuencia que no hibrida en su totalidad (en las posiciones +3 y +6) con el extremo 5' del U1 snRNA, lo cual no favorece el reconocimiento del exón 11. La debilidad y vulnerabilidad del exón 11 queda bien reflejada en el bajo nivel de inclusión que vemos en el minigen pSPL3 wt que lleva la secuencia corta del gDNA del gen *PAH* y no alberga los sitios naturales de *splicing* flanqueantes. El minigen pcDNA3.1 wt con una construcción más larga, que incluye los exones flanqueantes, también muestra niveles de *skipping* del exón 11, aunque en menor proporción.

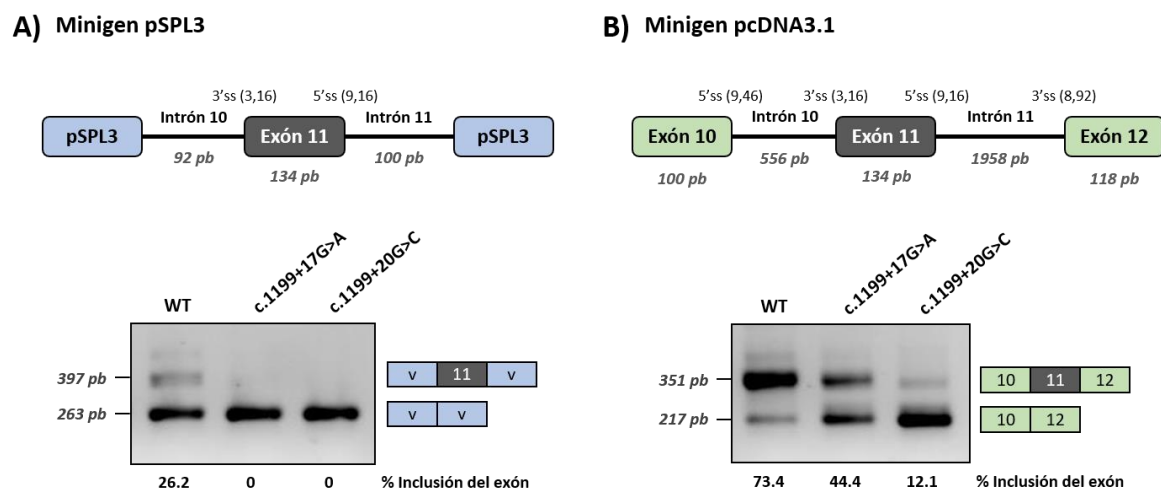


Figura 15. Análisis de las variantes c.1199+17G>A y c.1199+20G>C por minigenes. **A)** Construcción esquemática del minigen pSPL3 junto con el perfil transcripcional de las células Hep3B después de la transfección con los minigenes *wild-type* (wt) y mutantes. **B)** Esquema de la construcción del minigen pcDNA3.1 y análisis del perfil transcripcional de las células Hep3B. Los valores de los sitios de *splicing* fueron estimados usando el programa MaxEntScan (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html). A la derecha de cada gel se muestra un dibujo esquemático de la identidad de las bandas confirmada por secuenciación. El porcentaje de inclusión del exón se muestra bajo cada carril. V: secuencias del vector.

Con el objetivo de investigar el mecanismo por el cual se produce *exon skipping*, se realizó una serie de mutagénesis dirigidas en los minigenes. En primer lugar, se deletionó parte de la región intrónica de los minigenes wt eliminando los nucleótidos de las posiciones +13 a +19 (c.1199+13del7), +17 a +22 (c.1199+17del6) o los nucleótidos del +20 al +24 (c.1199+20del5) con el

fin de revelar la existencia potencial de elementos reguladores de *splicing* en esa región. Los cambios detectados según los programas informáticos acerca de los sitios de unión a factores de *splicing* para cada deleción se muestran en la **Tabla 13**. Las deleciones c.1199+13del7 y c.1199+17del6 tuvieron un efecto deletéreo en la inclusión del exón, simulando el efecto de las variantes c.1199+17G>A y c.1199+20G>C, mientras que la deleción c.1199+20del5 no tuvo efectos detectables (**Fig. 16**). Este resultado indicó que los nucleótidos comprendidos entre las posiciones +13 y +20 forman parte de una región reguladora requerida para el reconocimiento correcto del exón 11.

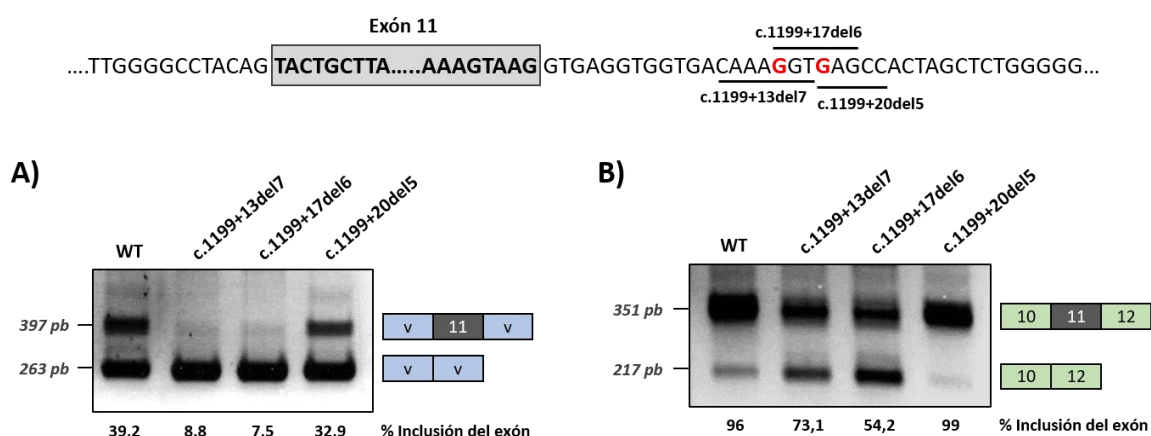


Figura 16. Efecto de las deleciones intrónicas en el perfil de *splicing* de los minigenes. Las deleciones c.1199+13del7, c.1199+17del6 y c.1199+20del5, mostradas en el esquema superior, son introducidas en los minigenes *wild-type* (wt) pSPL3 (**A**) o pcDNA3.1 (**B**) y examinado el efecto en el patrón de *splicing* después de su transfección en células Hep3B. A la derecha de cada gel se muestra un dibujo esquemático de la identidad de las bandas confirmada por secuenciación. El porcentaje estimado de inclusión del exón se muestra bajo cada carril. V: secuencias del vector.

Adicionalmente, al considerar que el efecto de ambas mutaciones podría depender de la naturaleza del sitio 5' de *splicing*, se optimizó su valor por remplazamiento de los nucleótidos de las posiciones +3 y +6 en los minigenes pcDNA3.1 wt y mutantes, con el fin de investigar si esto podía contrarrestar el defecto de *splicing* causado por las variantes intrónicas. La guanosina de la posición +3 fue remplazada por una adenina y la guanosina de la posición +6 por una timina. Estas sustituciones incrementaron al máximo el valor del sitio 5' natural de *splicing* de 9,6 a 11 (**Fig. 17**). En los minigenes mutantes +17 y +20, se observó un 100% de inclusión del exón con esas sustituciones. Además, en el minigen wt las sustituciones eliminaron por completo la banda residual de *skipping* del exón 11 (**Fig. 17**).

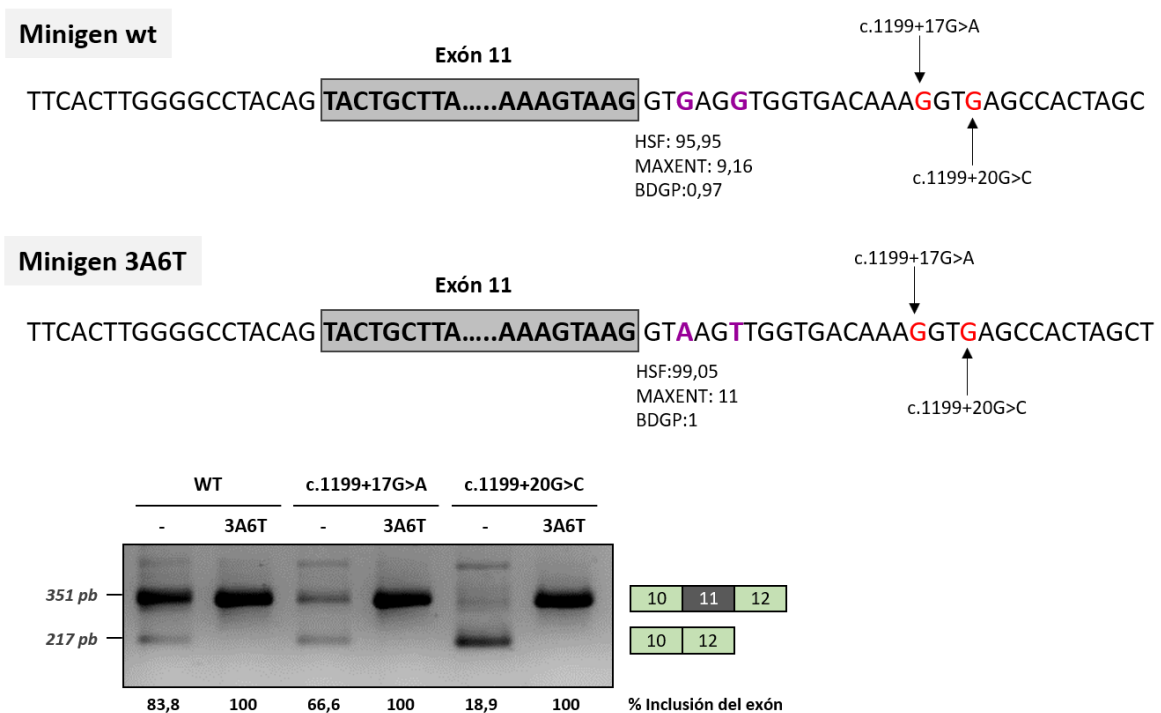


Figura 17. Efecto de la optimización del sitio 5' natural de *splicing* del exón 11 sobre su perfil transcripcional. El valor del sitio 5' de *splicing* fue optimizado en el minigen pcDNA3.1 introduciendo los cambios c.1199+3G>A y c.1199+6G>T como se puede ver en el panel superior junto con los valores según los programas HSF, MaxEntScan y BDGP. En el gel se muestran los resultados de RT-PCR después de la transfección de los minigenes pcDNA3.1 *wild-type* (wt) y mutantes con y sin el sitio 5' de *splicing* optimizado. A la derecha del gel se muestra un dibujo esquemático de la identidad de las bandas confirmada por secuenciación. El porcentaje estimado de inclusión del exón se muestra bajo cada carril.

El conjunto de estos resultados sugiere que las mutaciones c.1199+17G>A y c.1199+20G>C modifican la unión de factores de *splicing*, los cuales son requeridos para el correcto reclutamiento del espliceosoma al sitio 5' natural de *splicing*. Esto puede ser compensado incrementando la fuerza de dicho sitio y, por consiguiente, la afinidad de unión de U1 y de otros snRNPs, que son reclutados hacia el sitio 5' durante el proceso de *splicing*.

4.3. Sobreexpresión de factores de *splicing*

Para identificar los factores de *splicing* implicados en el reconocimiento del exón 11 realizamos experimentos de sobreexpresión. Los minigenes pSPL3 mutantes fueron co-transfectados en células Hep3B con vectores codificantes para diferentes factores de *splicing* seguido de un análisis por RT-PCR. Para la variante c.1199+17G>A solamente la sobreexpresión de las proteínas SRSF2 y hnRNPA1 inducían la inclusión del exón (**Fig. 18A**). Sin embargo, para la variante c.1199+20G>C la inclusión del exón no se vio inducida por ninguno de los factores de *splicing* co-transfectados (**Fig. 18B**).

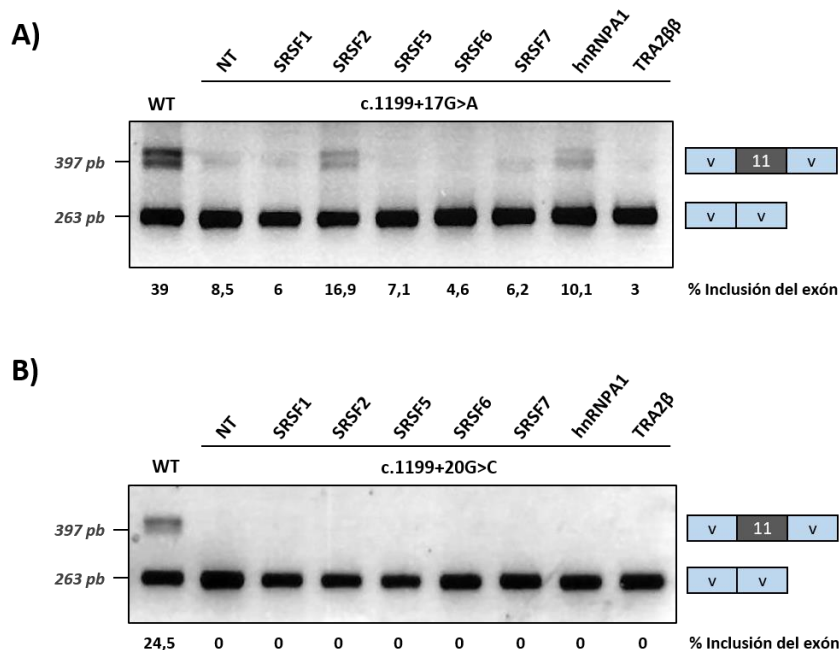


Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de factores de *splicing* sobre el perfil transcripcional asociado a las mutaciones c.1199+17G>A y c.1199+20G>C. Los geles muestran el resultado de la RT-PCR después de la co-transfección de los minigenes pSPL3 *wild-type* (wt) y mutantes +17a (A) y +20c (B) con vectores codificantes para diferentes factores de *splicing*. A la derecha de cada gel se muestra un dibujo esquemático de la identidad de las bandas confirmada por secuenciación. El porcentaje estimado de inclusión del exón se muestra bajo cada carril. NT: no co-transfectado.

4.4. Detección de proteínas unidas al RNA (*RNA affinity*)

Para determinar qué factor o factores de *splicing* pueden unirse a la región donde ambas mutaciones están localizadas, se hicieron estudios de *RNA affinity*. Se diseñaron oligonucleótidos de RNA que incluían las secuencias wt o mutadas con c.1199+17G>A y c.1199+20G>C que se incubaron con un extracto nuclear de células Hela. Después de la elución, las proteínas unidas a cada oligonucleótido fueron analizadas por *SDS-PAGE* y *Western blot*. Se estudió la presencia de las proteínas SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF5, SRSF7, U1snRNP70, Tra2β, hnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP I, hnRNP L, hnRNP K, hnRNP H y hnRNP E2. Los resultados mostraron la unión de SRSF1, SRSF3 y Tra2β sin diferencias significativas entre la secuencia wt y las secuencias mutantes (Fig. 19). SRSF2 exhibe una unión muy débil a la secuencia wt, que es casi indetectable en las secuencias mutantes. hnRNP A1 mostró una unión mayor a la secuencia mutante c.1199+20c. Sorprendentemente, el análisis mostró una fuerte unión de U1-70K a la secuencia wt, la cual desaparece con ambas secuencias mutantes (parcialmente con c.1199+17a y completamente con c.1199+20c) (Fig. 19). Estos resultados fueron reproducidos usando dos anticuerpos diferentes, uno policlonal anti-U1-70K y otro monoclonal anti-SR.

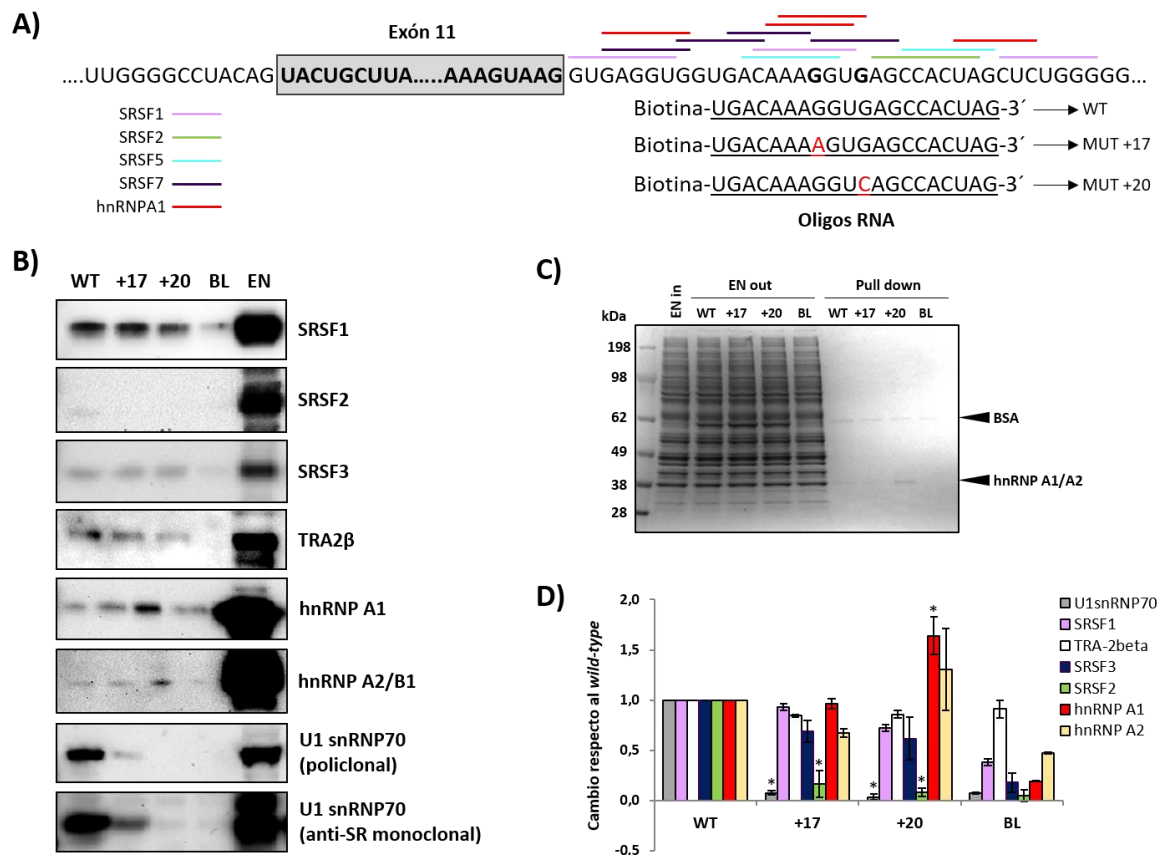


Figura 19. Análisis de proteínas unidas al RNA (RNA Affinity). **A)** Esquema representativo de la unión exón-intrón 11, mostrando los potenciales sitios de unión para los factores de *splicing* y los oligonucleótidos de RNA usados. **B)** Western Blots representativos de diferentes factores de *splicing* analizados para las secuencias *wild type* (wt) y mutantes +17a y +20c. **C)** Gel teñido con *Coomassie*; 15 µg de extracto nuclear de células Hela (EN in), la misma cantidad de extracto nuclear recogido después de la reacción de unión (EN out), y 7,5 µL (1/6) de los eluidos (*pull down*) fueron cargados y separados en geles SDS-PAGE, y teñidos con *Coomassie*. **D)** Cuantificación de los experimentos de *RNA affinity*; la intensidad de la señal de los Western blots fue cuantificada y normalizada con la señal obtenida de la reacción con la secuencia wt. Los resultados presentados son el promedio de 2 experimentos diferentes, y las barras de error muestran la desviación estándar de los mismos. El análisis estadístico es una prueba *T-Student* (* p valor<0,05). BL y EN indican los controles sin oligonucleótidos de RNA o con solo extracto nuclear, respectivamente.

Una inspección más a fondo de la región intrónica reveló un potencial sitio de unión para U1 snRNA alrededor de los nucleótidos GT que se encuentran en las posiciones +18 y +19, correspondiendo a un sitio 5' de *splicing* con un valor alto según los programas informáticos (**Fig. 20**). Ambas mutaciones eliminan uniones potenciales entre bases complementarias a la secuencia consenso de U1 snRNA, disminuyendo el valor de *splicing* de dicho sitio.

4.5. Análisis del sitio 5' críptico de *splicing*

Con el objetivo de determinar si la unión de U1 snRNA al sitio críptico de *splicing* +18 era relevante para el reconocimiento del exón 11, modificamos por mutagénesis dicha región en los minigenes wt, ya sea eliminando el GT (c.1199+18G>C) o reforzando el valor del sitio críptico de *splicing* para hacerlo idéntico a la secuencia consenso (c.1199+15A>C/+20G>A) (**Fig. 20**). Después de la transfección, los análisis de RT-PCR mostraron que la eliminación del GT resultaba en un incremento de *exon skipping*, mientras que el incremento de la fuerza de unión de U1 favorecía la inclusión del exón (**Fig. 20**).

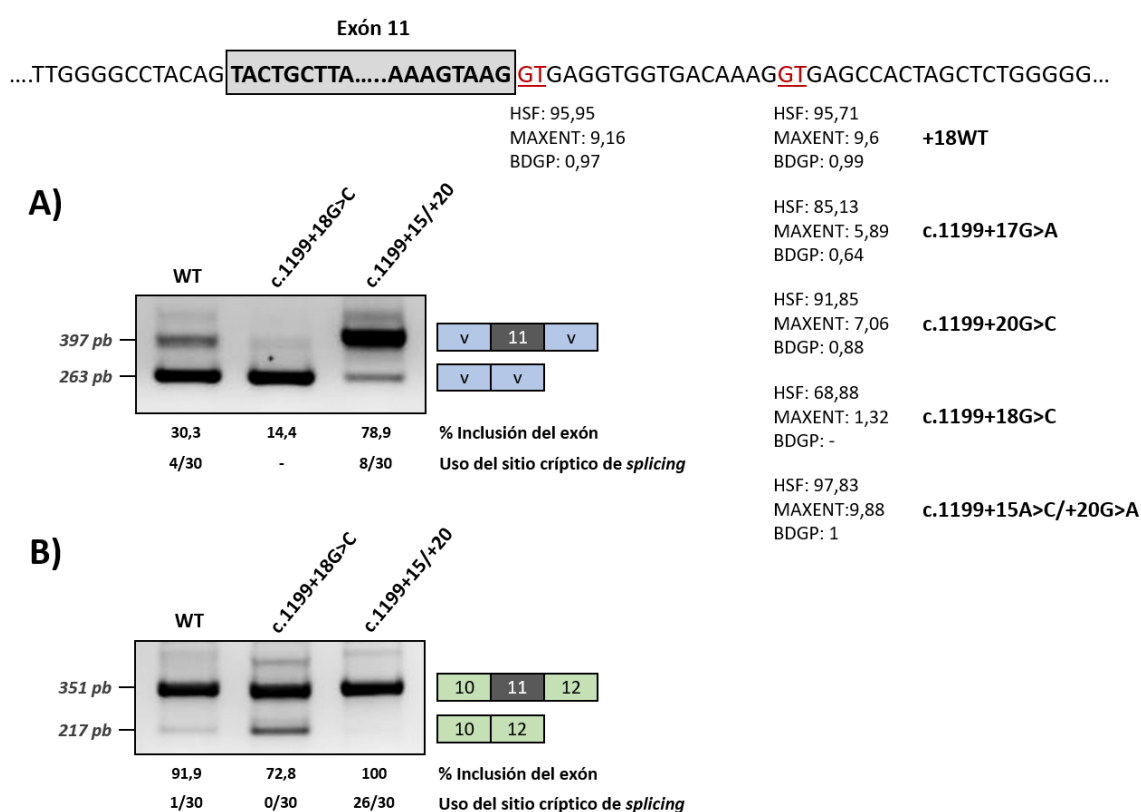


Figura 20. Efecto de las modificaciones del sitio 5' críptico de *splicing*. En el panel superior se muestra la localización y el valor de los sitios 5' de *splicing* natural y críptico calculados con los programas HSF, MaxEntScan y BDGP. El sitio críptico de *splicing* fue modificado por eliminación del GT (c.1199+18G>C) u optimización (c.1199+15A>C/+20G>A). Los gels muestran el resultado de la RT-PCR después de la transfección de los minigenes *wild-type* (wt) y mutantes en pSPL3 (**A**) o pcDNA3.1 (**B**). A la derecha de cada gel se muestra un dibujo esquemático de la identidad de las bandas confirmada por secuenciación. El porcentaje estimado de inclusión del exón y el uso del sitio críptico de *splicing* (número de clones en los que el *splicing* ocurre usando el sitio +18 sobre el total de los clones analizados, después de subclonar y secuenciar el producto amplificado de inclusión del exón) se muestran bajo cada carril. V: secuencias del vector.

Para investigar el posible uso del sitio críptico de *splicing* donde se une U1, se clonó la banda del producto de PCR obtenido correspondiente a la inclusión del exón 11 tanto de los minigenes wt como mutantes mostrados en la **Figura 20**. El análisis por secuenciación de los clones para los minigenes wt permitió identificar 4/30 (minigen pSPL3) y 1/30 (minigen pcDNA3.1) clones en los cuales el *splicing* había ocurrido usando el sitio críptico +18. Para la mutación c.1199+18G>C, que elimina el sitio críptico de *splicing*, todos los clones analizados mostraron un uso del sitio 5' natural de *splicing*, tal y como se esperaba. En el caso del minigen con los cambios c.1199+15A>C/+20G>A, el análisis de clonación y secuenciación permitió identificar 8/30 (minigen pSPL3) y 26/30 (minigen pcDNA3.1) clones en los que el sitio críptico modificado con un 5' optimo estaba siendo usado en lugar del sitio 5' natural de *splicing*. En el análisis de las secuencias pudimos identificar en algunos clones de los minigenes pcDNA3.1 un producto adicional de PCR correspondiente con la inclusión de una región intrónica de 25 pb (correspondiente a los nucleótidos comprendidos entre c.1199+538_+562), la cual podría ser un artefacto derivado del minigen o un exón críptico. Este transcrito fue identificado en 5/30 y en 6/30 clones resultantes de los minigenes wt y c.1199+18G>C, respectivamente; a diferencia del minigen mutante c.1199+15A>C/+20G>A donde no fue detectado.

Así, a pesar del alto valor del sitio críptico de *splicing* y la unión de U1 snRNP indicado por los estudios de *RNA affinity* descritos anteriormente, este sitio es usado en muy baja frecuencia como sitio de *splicing* en el contexto de los minigenes con la secuencia wt. La situación *in vivo* se investigó analizando los transcritos endógenos de la *PAH* en una muestra de hígado humano y en líneas celulares de hepatoma Hep3B y HepG2, esta última tratada o no con cicloheximida para bloquear la degradación del mRNA por el NMD. En todos los casos, el análisis por secuenciación después de subclonar el transcrito amplificado mostró que solo se utiliza el sitio 5' natural de *splicing*. En las muestras analizadas, se observó cierto *skipping* residual del exón, como se había descrito previamente (Gallego-Villar et al. 2014; Viecelli et al. 2014). En la muestra de hígado también se detectó la inserción intrónica de 25 pb, que parece ser un exón críptico.

En conjunto los resultados confirmaron que la unión de U1 al sitio críptico era necesaria para la eficiencia del reconocimiento del exón 11 y, este sitio críptico no es usado como sitio de *splicing* en el contexto natural (wt) tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otra parte, nos planteamos que la funcionalidad de la región intrónica que actúa como potenciador de *splicing* mediada por U1 muy probablemente dependiera de la distancia al exón 11. Para investigar esto, se estudió el efecto que produciría expandir la distancia por inserción de 1, 3 o 6 copias de un espaciador correspondiente a una secuencia de 6 pb que se encuentra delante del sitio de unión de U1 (**Fig. 21**). El resultado mostró un incremento de *skipping* del exón 11 con el

incremento del número de copias del espaciador. Con las tres construcciones (1, 3 y 6 copias del espaciador) se pudieron detectar transcritos correspondientes al uso del sitio crítico de *splicing* (ahora localizado a +24, +36 y +54, respectivamente).

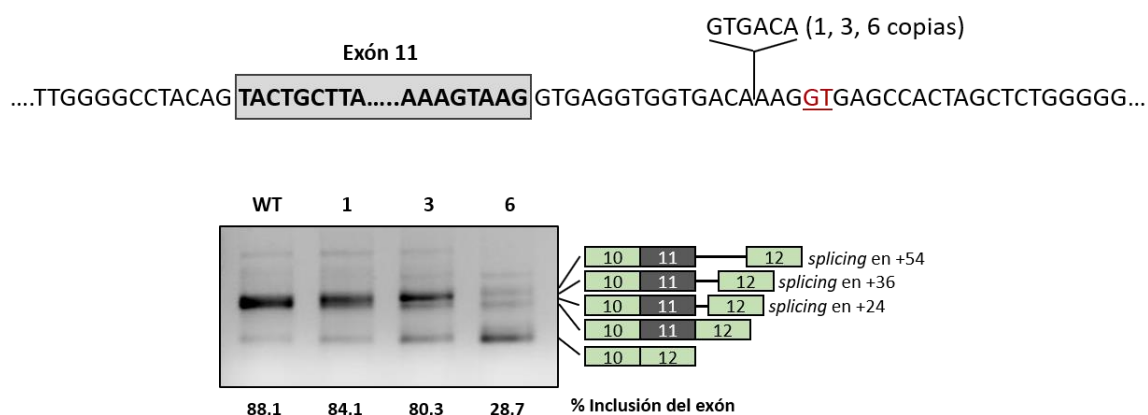


Figura 21. Efecto de la distancia de la región intrónica reguladora sobre el uso del sitio 5' natural de *splicing*. El panel superior muestra la localización y secuencia del espaciador introducido en el minigen pcDNA3.1 *wild-type* (wt) entre los sitios 5' natural y crítico de *splicing*. El gel muestra los resultados después de la transfección del minigen wt y de las construcciones con 1, 3 o 6 copias del espaciador en las células Hep3B. A la derecha del gel se muestra un dibujo esquemático de la identidad de las bandas confirmada por secuenciación, las cuales muestran el uso de ambos sitios de *splicing*, natural y crítico (+24 con 1 copia, +36 con 3 copias y +54 con 6 copias). Los porcentajes estimados de inclusión del exón se muestran bajo cada carril.

4.6. Sobreexpresión de U1 snRNAs adaptados

Finalmente, se generaron diferentes U1 snRNAs adaptados para investigar si se podía corregir el *skipping* del exón 11 producido por las variantes +17a y +20c forzando la unión de U1 a las secuencias mutantes. Esto confirmaría que el mecanismo patogénico de ambas mutaciones podría atribuirse a una deficiencia de unión de U1 a dicha región. Los U1 snRNA adaptados se diseñaron para exhibir una perfecta complementariedad al sitio 5' natural de *splicing* del exón 11 (U1 WT), al sitio crítico de *splicing* +18 (U1 18GT) o al sitio crítico de *splicing* con las mutaciones +17a (U1 +17) o +20c (U1 +20) (**Fig. 22A**). La **Figura 22B** muestra los resultados de los experimentos de co-transfección realizados con los minigenes pSPL3, donde se observa el *exon skipping* completo para los minigenes mutantes (**Fig. 15A**), lo cual facilita la detección incluso de leves incrementos de inclusión del exón 11.

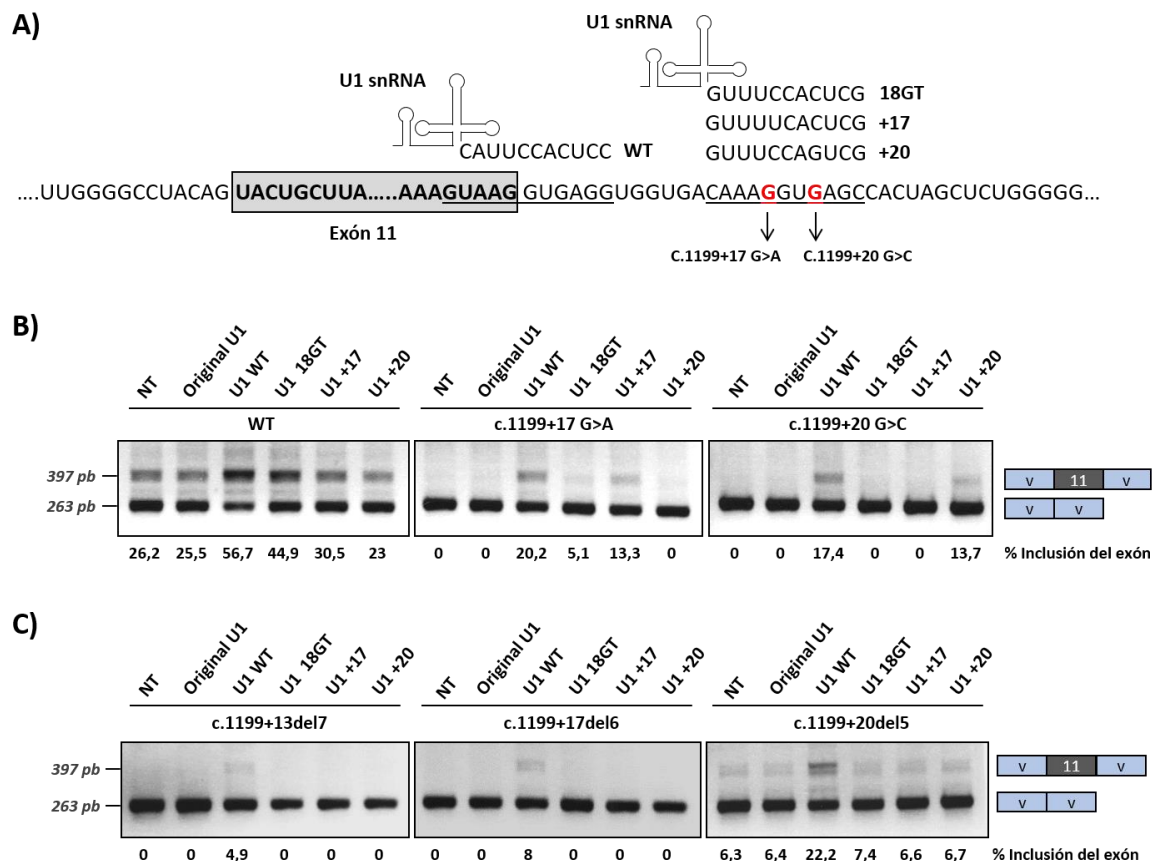


Figura 22. Co-transfección de los minigenes *wild-type* y mutantes con las construcciones de U1 snRNA adaptados.

A) Se generaron diferentes construcciones de U1 snRNA que hibridan con el sitio 5' natural de *splicing* del exón 11 de la PAH (U1 WT), con el sitio críptico de *splicing* (U1 18GT), o con el sitio críptico de *splicing* con las mutaciones +17a (U1+17) o +20c (U1+20). **B)** Resultado de la co-transfección de las diferentes construcciones de U1 con los minigenes pSPL3 *wild-type* (wt) y mutantes o **C)** con los minigenes que llevan las deleciones intrónicas c.1199+13del7, c.1199+17del6 y c.1199+20del5. A la derecha de cada gel se muestra un dibujo esquemático de la identidad de las bandas confirmada por secuenciación. En los paneles B y C los porcentajes estimados de inclusión del exón se muestran bajo cada carril. NT: no co-transfectado. V: secuencias del vector.

El U1 adaptado complementario al sitio 5' natural de *splicing* (U1 WT) favoreció la inclusión del exón para los minigenes wt y mutantes, como se esperaba según estudios previos ya comentados, donde esta aproximación ha sido usada exitosamente para corregir defectos de *splicing* (Pinotti et al. 2008; Tanner et al. 2009). Se observó cierto efecto positivo con la construcción U1 18GT complementaria al sitio críptico de *splicing* para el minigen wt. Para cada minigen mutante la co-transfección con su correspondiente U1 adaptado (U1 +17 o U1 +20) resultó en un incremento de la inclusión del exón (**Fig. 22B**). Las bandas de PCR correspondientes a la inclusión del exón observadas después de la co-transfección de los minigenes mutantes con los U1 adaptados, fueron clonadas y secuenciadas y, en todas las colonias (30 de cada uno), el *splicing* ocurrió usando el sitio 5' natural de *splicing*. El hecho de que el U1 +17 corrija solo el defecto de *splicing* sobre el minigen

con la mutación +17a y el U1 +20 solo sobre el minigen con la mutación +20c apoya la noción de que la unión de U1 entre las posiciones +15 y +24 estimula el uso del sitio 5' natural de *splicing*.

También se co-transfectaron las construcciones de los U1 adaptados y los minigenes con las deleciones descritas en la **Figura 16** (c.1199+13del7, c.1199+17del6 y c.1199+20del5), para confirmar que el U1 +17 y el U1 +20 se unen realmente al sitio crítico de *splicing* y no a otra parte. Como se muestra en la **Figura 22C** sólo con la unión del U1 WT al sitio 5' natural de *splicing* se incrementa la inclusión del exón.

DISCUSIÓN

1. Uso de miMCs como estrategia de vehiculización de AONs

El procesamiento del pre-mRNA (*splicing* y poliadenilación) así como la regulación de la dinámica del mRNA (traducción, estabilidad y localización del mRNA) juegan un papel importante en muchas enfermedades hereditarias (Manning and Cooper 2017) y se está convirtiendo en una diana importante para la intervención terapéutica; en consecuencia, las estrategias que modulan la función del RNA han ganado gran interés en la última década. Los AONs son quizás la herramienta terapéutica más prometedora para la modulación del *splicing* que recientemente ha demostrado excelentes resultados, estando ya en fase clínica para varias enfermedades y aprobada para su uso en pacientes (Crooke et al. 2018). De hecho, estudios previos del laboratorio evidenciaron el potencial de los AONs como estrategia terapéutica para la modulación del *splicing in vitro* e *in vivo* de genes implicados en EMHs (Perez et al. 2010; Gallego-Villar et al. 2014). Sin embargo, el uso de AONs aún enfrenta problemas que incluyen una baja captación celular, una baja especificidad cuando se dirigen a tejidos concretos y una rápida eliminación de la circulación, lo que significa que las inyecciones repetidas son esenciales para completar la eficacia terapéutica (Imbert et al. 2017). En el laboratorio, el uso *in vivo* utilizando VPMO mostró una alta toxicidad y poca estabilidad (Gallego-Villar et al. 2014). Para superar estas limitaciones, la vectorización de secuencias antisentido que utilizan el sistema U7 snRNA modificado en vectores virales ofrece nuevas posibilidades (De Angelis et al. 2002; Brun et al. 2003). La opción de usar snRNAs en vectores virales ofrece muchas ventajas, entre las que se encuentran la localización subcelular específica y la posible corrección a largo plazo, así como la limitación de la toxicidad inducida por la administración de AONs de por vida. Además, dado que los snRNAs se dirigen al pre-mRNA natural del gen diana, los efectos son específicos, evitando cualquier expresión ectópica del gen "corregido" (Imbert et al. 2017). Son varios los estudios en los que un U7 snRNA modificado (U7SmOPT) fusionado a un AON media la modulación terapéutica del *splicing* alternativo promoviendo el *skipping* de un exón, como es el caso de DMD (Goyenvalle, Babbs, et al. 2012), o favoreciendo su inclusión como ocurre en SMA (Odermatt et al. 2016) y en la enfermedad de Pompe (van der Wal et al. 2017). Esta terapia antisentido mediada por vectores virales que codifican para U7 snRNA representa una herramienta muy prometedora para el tratamiento de enfermedades genéticas, sin embargo, es necesario superar las barreras inmunológicas que suscitan los vectores virales y las secuencias bacterianas en los entornos en los que se introducen.

De esta necesidad surgen los MCs, vectores plasmídicos que contienen exclusivamente el *cassette* de expresión eucariota y, por tanto, carecen de las secuencias bacterianas. Inicialmente se construye un plásmido parental que incluye el *cassette* de expresión eucariota flanqueado por sitios

de recombinación. Fuera de estos sitios están las secuencias necesarias para la propagación del plásmido en bacterias. La inducción de la recombinación produce un MC de pequeño tamaño que contiene solo el gen de interés con las secuencias reguladoras adecuadas donde las secuencias procariotas (origen de replicación y genes de resistencia a antibióticos) se han eliminado (Stenler, Blomberg, et al. 2014). Los MCs tienen la ventaja de que son capaces de expresar de manera persistente altos niveles del producto terapéutico *in vitro* e *in vivo* (Chen et al. 2003; Dietz et al. 2013), presentan una mayor estabilidad (Zhao et al. 2011), su pequeño tamaño permite la administración de dosis más altas, y confieren una mayor protección frente a la respuesta inmune (Dietz et al. 2013). Un estudio previo mostró la eficacia de esta estrategia para la terapia antisentido, produciendo miMCs codificantes para U7 snRNA modificado y fusionado a la secuencia del AON, que promueve el *exon skipping* en modelos murinos mediante inyección hidrodinámica (Stenler, Wiklander, et al. 2014). En este trabajo, el objetivo fue investigar la eficacia de los miMC como vehículo para la terapia antisentido empleando “U7SmOpt-asPMOex11” como plásmido parental, que contiene un *cassette* de expresión para U7SmOpt snRNA fusionado a una secuencia antisentido complementaria al sitio 5' de *splicing* del exón 11 del gen *PAH* (Fig. 10), previamente testada *in vitro* e *in vivo* para promover la exclusión de dicho exón (Gallego-Villar et al. 2014). Durante la formación de los miMCs (675 pb) no solo encontramos la forma monomérica, sino también detectamos dímeros, trímeros y tetrameros (Fig. 11). Está descrito que existe una relación inversa entre la longitud del DNA y la eficiencia de la recombinación intermolecular (Fogg et al. 2006), es decir, que la longitud del DNA del miMC podría ser demasiado corta para permitir que la recombinación requerida tenga lugar de manera eficiente. En el caso de los miMCs, los multímeros son producidos de manera natural por la recombinasa en el proceso de fermentación (Stenler, Wiklander, et al. 2014). En el experimento en el que comparamos el efecto de las diferentes construcciones sobre el perfil transcripcional de la *PAH*, la multimerización no pareció tener ningún efecto (Fig. 12). La transfección de la línea Hep3B con el plásmido parental, el DNA aislado tras la inducción y la forma monomérica purificada, portando la secuencia de interés PMOex11, y controles que carecen de ella, resultó en un *skipping* parcial (30-40%) del exón 11 con la fracción monomérica de los miMCs, independientemente de la cantidad de DNA administrada y del tiempo de recogida de las células (Fig. 12). Esto supone un efecto muy diferente al observado en estudios previos en el laboratorio con AONs, donde la transfección de células Hep3B con el AON de tipo morfolino (PMOex11) inducía el 100% de *skipping* del exón 11 del gen *PAH* (Gallego-Villar et al. 2014).

Estos resultados sugieren una baja eficacia en nuestro modelo experimental de los miMCs como vehículo para la terapia con AONs, de hecho, este resultado quizás pueda ser general, dado

que no se han reportado nuevos trabajos utilizándolos en la modulación de *splicing*, a pesar de que los MCs sean una buena herramienta en la terapia celular y génica (Monjezi et al. 2017; Holstein et al. 2018). Por otra parte, la terapia con AONs administrados sin ningún agente ha experimentado grandes avances en los últimos años, hasta el punto de alcanzar la fase de ensayos clínicos e incluso son varios los casos en los que han sido aprobados por la FDA como fármacos (Levin 2019), algunos dirigidos a silenciamiento génico y otros a modular el *splicing*. La mayoría de los AONs que están en ensayos clínicos se administran vía intravenosa, lo que hace que se distribuyan al hígado, riñón, médula ósea, ganglios linfáticos y una pequeña parte que se acumula en los adipocitos (Geary et al. 2015; Godfrey et al. 2017). En el caso de “eteplirsén”, un AON de tipo PMO aprobado para su uso en DMD con el fin de inducir el *skipping* del exón 51 dando lugar a una proteína más corta pero funcional, la administración se realiza por infusión intravenosa. Sin embargo, presenta el inconveniente de su rápida excreción a través de la filtración glomerular de manera que solo una pequeña fracción es absorbida por el músculo esquelético (Aartsma-Rus et al. 2017). “Nusinersén” es un oligonucleótido de tipo 2'-MOE aprobado para su uso en SMA administrado por inyección intratecal. Este fármaco fuerza la inclusión del exón 7 del pre-mRNA SMN2, produciendo una proteína SMN funcional (Finkel et al. 2017). En el caso de “mipomersén” con una química también de tipo 2'-MOE y aprobado para el tratamiento de hipercolesterolemia por reducción de los niveles del mRNA de ApoB, la administración se realiza por inyección subcutánea, conduciendo a una disminución de los niveles de colesterol LDL en circulación (Duell et al. 2016; Ray et al. 2017).

En definitiva, a pesar de los grandes avances de la terapia con AONs, dos importantes obstáculos dificultan su aplicación generalizada: la seguridad (algunos AONs inducen una respuesta inmune dependiendo en gran medida de la secuencia) y la administración eficiente a tejidos y células específicas. Estos efectos se tratan de minimizar con nuevas versiones de oligonucleótidos en los que se ha mejorado la química o se ha hecho más eficaz la administración en un esfuerzo por reducir dosis que resultan tóxicas (Levin 2019). De momento, se siguen investigando nuevas estrategias de direccionamiento a tejidos como es el caso de la conjugación de los AONs a N-acetilgalactosamina (GalNAc) que se une a los receptores asialoglicoproteína (ASGPR) en los hepatocitos para su transporte y liberación específica en hígado (Huang 2017). Este sistema únicamente es válido para el tratamiento de enfermedades asociadas a proteínas derivadas de los hepatocitos o enfermedades hepáticas. Para el resto de los tejidos, como músculo, se está estudiando la conjugación de AONs a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra proteínas de la superficie celular que se sabe que están involucradas en el transporte intracelular (Sugo et al. 2016). Recientemente se está empleado con éxito la estrategia de CRISPR/Cas9 como una aproximación terapéutica para la corrección del *splicing* aberrante causado por mutaciones

intrónicas profundas (Sanz et al. 2017; Xu et al. 2019), pudiendo ser una alternativa a la terapia antisentido en algunos casos.

2. Identificación y análisis de variantes intrónicas profundas en el gen *PAH*

El análisis genético permite la confirmación de un diagnóstico clínico o bioquímico. La identificación del gen responsable y de las variantes patogénicas no solo permite el asesoramiento genético en las familias sino también, en muchos casos, la aplicación de una terapia personalizada. En el caso de la HFA, una condición bioquímica detectada en el cribado neonatal, causada en el 98% de los casos por defectos en el gen *PAH* y el 2% en genes implicados en la síntesis y regeneración de su cofactor BH₄ o en el gen de la chaperona DNAJC12, cada uno de los defectos va a requerir una terapia diferente. Además, en el caso de los defectos en *PAH* la identificación de las variantes patogénicas permite la aplicación de terapias específicas (Blau et al. 2014).

Gracias a la secuenciación masiva, el análisis genético es mucho más rápido y eficaz que hace 5 años donde las confirmaciones genéticas se realizaban gen por gen mediante secuenciación por *Sanger*. Sin embargo, aunque la secuenciación del exoma completo ha acelerado la capacidad para identificar variantes que explican muchas enfermedades mendelianas, su tasa de éxito oscila entre el 25% y el 50% de pacientes diagnosticados (Kremer et al. 2017; Cummings et al. 2017). Uno de los motivos que pueden explicar la baja tasa de rendimiento diagnóstico es que esta aproximación es ciega a la presencia, entre otras, de variantes intrónicas internas que causan inserción patológica de pseudoexones. Este tipo de mutaciones son frecuentes en las enfermedades genéticas (Dhir and Buratti 2010; Vaz-Drago et al. 2017), y para su identificación es imprescindible el análisis del perfil transcripcional del correspondiente gen (Wang et al. 2009; Byron et al. 2016), sin embargo, esta técnica requiere de células o tejido del paciente donde se expresa el gen de interés. De hecho, en este trabajo, debido a la expresión hepática del gen *PAH*, resulta imposible realizar estudios de transcriptómica por lo que hemos propuesto como alternativa la captura completa de las 90 kb del gen combinado con la aplicación de un análisis bioinformático diseñado para la priorización de las posibles variantes patogénicas (**Fig. 13**). En los inicios del trabajo, la priorización se basó en la presencia o ausencia de las variantes en los casos analizados con otras patologías ya que el gen se capturaba en un panel de metabolopatías. Posteriormente, el análisis se ha refinado con las bases de datos que recogen datos de secuenciación de genomas completos y, por tanto, la presencia de SNVs en regiones no codificantes evidenciando la permanente evolución de los procesos. Es de destacar que la priorización de variantes para distinguir entre aquellas que pueden ser patogénicas y las que no lo son es una tarea ardua que en muchos casos lleva a ignorar cambios genéticos que podrían ser causantes de enfermedad. Aunque la inclusión de pseudoexones como consecuencia

de variantes de un solo cambio nucleotídico son más frecuentes (Vaz-Drage et al. 2017) y, en este estudio se han priorizado para facilitar la búsqueda, no podemos descartar que la existencia de pequeñas deleciones en regiones intrónicas profundas conduzcan a la inclusión de secuencias intrónicas, como ocurre en DMD donde la deleción de 18 nucleótidos está asociada con la inclusión de un pseudoexon de 77 pb entre los exones 37 y 38 del gen de la distrofina (Bovolenta et al. 2008), o en fibrosis quística (CF) donde la inclusión aberrante de una secuencia de 101 pb entre los exones 6 y 7 del gen *CFTR* se debe a una deleción de 4 nucleótidos (Faa et al. 2009).

El proceso de priorización basado principalmente en la frecuencia alélica y en el análisis de segregación mendeliana junto con un análisis *in silico* mediante predictores del efecto sobre el *splicing* ha permitido la selección de 5 variantes como candidatas a ser patogénicas (**Tabla 12**). Sin embargo, tras su análisis funcional utilizando un sistema de minigenes se ha evidenciado que ninguna de ellas causa la inserción potencial de un pseudoexon (**Fig. 14**). Estos resultados ponen de manifiesto que, aunque las herramientas bioinformáticas son útiles en la priorización de las variantes, los estudios funcionales que verifiquen el efecto de los cambios detectados son imprescindibles para un correcto diagnóstico (Bonini et al. 2015; Liquori et al. 2016; Palhais et al. 2016).

Los estudios presentados en este trabajo no han permitido identificar la segunda mutación en los pacientes con HFA. La captura de la secuencia completa del gen no permite la detección ni de mutaciones en regiones promotoras distales que se han descrito asociadas a enfermedades hereditarias como las detectadas en pancreatitis crónica (CP) (Hegyi et al. 2016) o el síndrome nefrótico (NS) (Oleggini et al. 2006), ni de mutaciones que conducen a una expresión alélica desbalanceada; como es el caso de un polimorfismo (con una alta frecuencia poblacional) en *cis* con la mutación patogénica en el gen *PEX6* en individuos heterocigotos (Falkenberg et al. 2017), o las epimutaciones como es el caso del gen *MMACHC* (Gueant et al. 2018). Así, una vez descartada la presencia de mutaciones intrónicas internas, el paso siguiente en el caso del gen *PAH* sería la secuenciación del genoma completo para identificar otras variantes en este gen o en otros que expliquen esta patología. También existe la posibilidad de la generación de hepatocitos a partir células madre pluripotentes inducidas (iPSC) derivadas de fibroblastos de los pacientes lo que nos permitiría un análisis del transcriptoma.

En resumen, la secuenciación masiva de DNA ha revolucionado los estudios genéticos, pero no es una herramienta infalible para completar el diagnóstico genético. Hace falta combinarlo con otras aproximaciones -ómicas y análisis funcionales para ofrecer un diagnóstico preciso. En poco tiempo, hemos pasado de disponer solo de herramientas para el estudio molecular dirigido de algunas enfermedades, necesariamente basado en una sospecha clínica muy fundamentada, a

tener la posibilidad de realizar un análisis completo del exoma (la parte codificante), del transcriptoma, y en última instancia del genoma completo de un paciente.

3. Análisis funcional y aproximaciones terapéuticas para nuevas variantes de *splicing* en HFA

En el diagnóstico genético es necesaria la confirmación de la naturaleza patogénica de las variantes identificadas. Los avances en el campo de la investigación biomédica han llevado al descubrimiento de un número cada vez mayor de enfermedades causadas por *splicing* alternativos o aberrantes a través de la exclusión de un exón, la selección de un sitio críptico de *splicing* o la retención de secuencias intrónicas (pseudoejones) (Chen and Manley 2009). Estos efectos pueden ser debidos a mutaciones localizadas en los sitios conservados 3' y 5' de *splicing*, en los sitios de unión a proteínas reguladoras de *splicing* o ubicadas en regiones intrónicas profundas que activan o crean secuencias de *splicing* (Perez et al. 2010). Se estima que hasta un 62% de las mutaciones puntuales causantes de enfermedad afectan al *splicing* (Lopez-Bigas et al. 2005). Para este tipo de defectos, el análisis transcripcional utilizando células de pacientes o ensayos basados en minigenes proporciona información sobre la patogenicidad de las variantes, la predicción de la gravedad de la enfermedad y la elucidación del mecanismo de *splicing*. Esto proporciona a su vez información sobre los elementos reguladores que definen un exón y cuáles son las dianas para diseñar las posibles aproximaciones terapéuticas (Baralle and Buratti 2017).

En este trabajo hemos demostrado la naturaleza patogénica de variantes nuevas identificadas en pacientes con HFA, en concreto dos variantes en el gen *PTS* y dos en el gen *PAH*.

En el caso del gen *PTS*, se identificaron en un paciente una variante intrónica interna (c.164-672C>T) y otra que afecta al sitio 5' de *splicing* del exón 4 (c.243+3A>G). El análisis del perfil transcripcional de los fibroblastos del paciente confirmó un defecto de *splicing* para ambas (Fig. 5A), el cual puede ser revertido en un sistema de minigenes usando aproximaciones terapéuticas dirigidas al RNA, como el uso de AONs o de un U1 snRNA adaptado.

En los últimos años se ha vuelto cada vez más evidente que la activación de pseudoejones por mutaciones intrónicas profundas representa un importante mecanismo de enfermedad (Dhir and Buratti 2010; Vaz-Drago et al. 2017). Este tipo de mutaciones suelen activar sitios crípticos de *splicing*, aunque el mecanismo más común implica la creación de un nuevo sitio 5' donador de *splicing* que se usa junto con un sitio 3' aceptor críptico de *splicing* ya existente. Los pseudoejones asociados con enfermedades varían en tamaño desde 30 hasta 344 pb y aproximadamente la mitad de ellos derivan de elementos transponibles, en particular elementos *Alu* (Vorechovsky 2010). La

aparición de un pseudoexón generalmente interrumpe la pauta de lectura introduciendo un codón de terminación prematuro que lleva al mRNA mutante a la degradación por NMD (Popp and Maquat 2013). El tratamiento de las células de los pacientes con cicloheximida, puromicina u otros compuestos que eviten el NMD puede ayudar a la identificación de estos pseudoexones activados y de la mutación responsable, mutaciones difíciles de localizar en el diagnóstico genético rutinario basado en el estudio del exoma. Estudios previos en el gen *PTS* demostraron la activación de pseudoexones por tres mutaciones distintas en el intrón 1 (c.84-322A>T) y en una determinada región intrónica profunda del intrón 2 (c.163+695_163+751del57 y c.164-712A>T). La activación de dichos pseudoexones coincide con la inserción de elementos transponibles, una secuencia LINE-2 en el intrón 1 y una secuencia *Alu* en el intrón 2 (Meili et al. 2009; Brasil et al. 2011). Esto fue indicativo de que variantes intrónicas profundas en estas regiones podrían ser mutaciones patogénicas. La secuenciación por *Sanger* de la región del intrón 2 en el DNA del paciente permitió identificar una nueva variante, c.164-672C>T, que según las predicciones bioinformáticas crea un potencial sitio 5' de *splicing*. El estudio del perfil transcripcional de los fibroblastos del paciente (**Fig. 5A**) junto con el análisis individual de la variante mediante un sistema *ex vivo* de minigenes (**Fig. 6B**) revelaron el carácter patogénico de la mutación determinado por la activación de pseudoexones de 45 (detectado solo en los fibroblastos en muy baja proporción), 70, 93 y 118 pb entre los exones 2 y 3 del gen *PTS* (**Fig. 5B**). Las dos primeras inserciones se corresponden con pseudoexones previamente identificados que pueden ser activados por diferentes mutaciones (Brasil et al. 2011), y las dos últimas se corresponden con el uso del nuevo sitio 5' de *splicing* en combinación con diferentes sitios 3' crípticos de *splicing*. Hay ejemplos previos en la literatura de la inclusión de múltiples pseudoexones como consecuencia de una mutación puntual creando un sitio consenso de *splicing de novo* (Grodecka et al. 2017). Este mecanismo puede deberse a la competición existente entre el sitio natural de *splicing* y los sitios *de novo*, es decir, la creación de un sitio críptico de *splicing* impide que se reconozca el sitio natural, lo que conduce a la activación de varios sitios crípticos de *splicing* y a la inclusión de pseudoexones.

Como se ha mencionado en el apartado 1, la terapia con AONs se ha aplicado con éxito en varios modelos celulares de una amplia variedad de enfermedades causadas por mutaciones intrónicas para evitar la inclusión de exones crípticos, pudiendo dirigir los AONs a los sitios de *splicing*, a puntos de ramificación u a otros elementos reguladores, como potenciadores o silenciadores de *splicing* (Sibley et al. 2016). En vista de esto, aquí se muestra un nuevo ejemplo de rescate de un proceso de *splicing* aberrante debido a la inserción de pseudoexones. Para ello, se utilizaron oligonucleótidos con tres químicas diferentes (2'-OMePS, PMO y VPMO) que actúan bloqueando, por impedimento estérico, el reconocimiento y la unión de componentes del

espliceosoma a la región de los pseudoexones. El análisis del perfil transcripcional en el sistema de minigenes (**Fig. 7**), así como en los fibroblastos derivados del paciente (**Fig. 8**) revela una disminución en la inclusión de pseudoexones, independientemente de la química del oligonucleótido empleado. Para mejorar la terapia con AONs y conseguir un rescate completo del transcrito normal habría que optimizar el diseño de AONs, haciendo un rastreo completo de AONs que cubran toda la región dirigidos también a secuencias potenciadoras de *splicing* localizadas dentro y fuera de los pseudoexones. En DMD se ha demostrado que los AONs dirigidos a las secuencias reguladoras internas del exón son más eficientes en forzar el *exon skipping* que aquellos dirigidos a los sitios de *splicing* conservados (Aartsma-Rus et al. 2010) y, en disautonomía familiar (FD) se sugiere que la mejor región diana para el uso de AONs se encuentra en una región intrónica (Sinha et al. 2018). Recientemente, la terapia con AONs dirigida a secuencias potenciadoras de *splicing* dentro de pseudoexones ha resultado exitosa en el rescate de los transcritos normales (Liquori et al. 2016; Albert et al. 2018).

Adicionalmente, el análisis genético permitió identificar la segunda variante en el gen *PTS* en el paciente: c.243+3A>G, que afecta al sitio 5' de *splicing* del exón 4. Variantes en la posición +3 del sitio 5' de *splicing* inducen un *splicing* aberrante en algunos casos, pero en otros no. Esto se debe a que, en humanos, ambas bases, A y G, están prácticamente igual de conservadas (Madsen et al. 2006; Le Guedard-Mereuze et al. 2009). En la actualidad, se han encontrados más de 9.000 variantes en la región -3 a +6 del sitio 5' de *splicing* asociadas con enfermedades hereditarias humanas por interferir en la interacción del U1 snRNP con el sitio 5' de *splicing* del pre-mRNA (Roca et al. 2012). Cuando el sitio natural de *splicing* esta mutado, con frecuencia se utilizan sitios crípticos de *splicing* (Roca et al. 2013) o en su defecto el sitio natural de *splicing* de los exones flanqueantes, lo que conduce al *skipping* del exón que se encuentra cerca de la mutación. La selección fidedigna del sitio natural de *splicing* no solo se basa en el reconocimiento del sitio 5' de *splicing*, sino que resulta del efecto combinatorio de proteínas como las proteínas SR y hnRNP que se unen al pre-mRNA y estabilizan las interacciones del espliceosoma o inhiben el reclutamiento de sus componentes (Liu et al. 1998; Dreyfuss et al. 2002). En este caso, el análisis del perfil transcripcional de los fibroblastos del paciente (**Fig. 5A**) junto con el análisis individual de la variante mediante minigenes (**Fig. 6E**) confirman la patogenicidad de la mutación causando el *skipping* del exón 4. En los fibroblastos del paciente este exón se elimina junto con el exón 3 en cierta proporción y además se detectan moléculas con el *skipping* aislado del exón 3 (que se da de forma natural (Liu et al. 2001)). Esta descrito que variantes que afectan a los sitios donadores o aceptores de *splicing* pueden resultar en la exclusión de varios exones (Fang et al. 2001; Hori et al. 2013), particularmente si la regulación del proceso de *splicing* de exones adyacentes está vinculada. Esto es lo que ocurriría

con los exones 3 y 4 que podrían fusionarse tras la eliminación inicial del intrón 3, actuando subsiguientemente como un único exón, posiblemente como consecuencia del pequeño tamaño tanto del exón 3 (23 pb) como de su intrón (395 pb).

El uso de un U1 snRNA adaptado con un extremo 5' perfectamente complementario al sitio 5' de *splicing* mutante se ha usado exitosamente como estrategia terapéutica para la restauración del *splicing* aberrante (Pinotti et al. 2008; Tanner et al. 2009; van der Woerd et al. 2015; Scalet et al. 2019). En este trabajo se ha buscado suprimir el defecto de *splicing* por sobreexpresión de un U1 snRNA adaptado (**Fig. 9A**) para compensar el efecto de la variante c.243+3A>G. Los estudios iniciales realizados en el sistema de minigenes indican que la pérdida de la unión de U1 al sitio 5' de *splicing* mutado es responsable de la exclusión del exón 4 observada, pues hay una recuperación del 100% del perfil transcripcional normal con el U1ex4mut complementario desde las posiciones -3 a +6 (**Fig. 9B**). Al contrario que en los minigenes, los estudios preliminares en los fibroblastos derivados del paciente utilizando el U1 snRNA adaptado, no han permitido corregir el defecto de *splicing* de la mutación (**Fig. 9C**), siendo necesario optimizar esta estrategia terapéutica en los fibroblastos. Está descrito que los U1 snRNAs adaptados pueden interaccionar inespecíficamente con otros sitios 5' de *splicing* (Balestra et al. 2014), con lo cual habría que aumentar la especificidad aumentando el número de bases complementarias entre el U1 snRNA adaptado y el sitio 5' de *splicing* mutado. De hecho, se ha demostrado que un mayor apareamiento de bases entre ambas secuencias aumenta la inclusión exónica, la eficiencia del *splicing* y la estabilidad del pre-mRNA (Freund et al. 2005). Así mismo, sería interesante desarrollar la estrategia de U1 snRNA específico de exón (ExSpeU1) para su unión de forma complementaria a secuencias intrónicas no conservadas, corriente abajo del sitio 5' donador de *splicing*, probada con éxito en otras enfermedades hereditarias (Fernandez Alanis et al. 2012; Tajnik et al. 2016; Rogalska et al. 2016). De esta forma, no sólo se refinaría la estrategia terapéutica al aumentar su especificidad, sino que el mismo U1 snRNA modificado podría ser utilizado como terapia para corregir diversas mutaciones de *splicing* que afecten al sitio 5' de *splicing* del exón 4 del gen *PTS*.

Por otra parte, dado que el patrón de *splicing* puede variar dependiendo del tipo celular (Heintz et al. 2012; Palhais et al. 2016) y la expresión del gen *PTS* en cerebro, sería interesante estudiar el efecto de las diferentes estrategias terapéuticas empleadas en este trabajo sobre el perfil transcripcional de los minigenes transfectados en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y.

En este trabajo también hemos elucidado la naturaleza patogénica de dos mutaciones puntuales intrónicas en el gen *PAH* (c.1199+17G>A y c.1199+20G>C) localizadas fuera del sitio 5' natural de *splicing* y que sorprendentemente causan *skipping* del exón 11. Nuestros resultados han permitido identificar una nueva región en el intrón 11 de la *PAH* que funciona como un ISE para el

exón 11 que presenta un sitio 3' aceptor de *splicing* débil y un sitio 5' subóptimo. Eliminar la región intrónica o aumentar la distancia al sitio 5' natural de *splicing* provoca el *skipping* del exón (**Fig. 16** y **Fig. 21**) indicando la necesidad de dicha región para el correcto reconocimiento del exón 11. Es de destacar que este ISE alberga un sitio de unión para U1 snRNA y que los estudios de afinidad demostraron que U1-70K se une a esta región en la forma wt, y la unión se pierde con las mutaciones c.1199+17G>A y c.1199+20G>C, por disminución de la complementariedad con U1 snRNA (**Fig. 19**).

Además, la supresión en los minigenes wt de los nucleótidos GU canónicos para la unión de U1 en la región intrónica aumenta el *skipping* residual del exón (**Fig. 20**). Por el contrario, el aumento de la complementariedad con U1 snRNA en la región intrónica da como resultado la inclusión completa del exón (**Fig. 20**). Los resultados obtenidos después de co-transfectar U1 snRNA adaptados a cada una de las secuencias intrónicas mutantes proporcionan una evidencia adicional del papel de la unión intrónica de U1 en el correcto reconocimiento del sitio 5' natural de *splicing* del exón 11 de la PAH. Solo el U1 snRNA perfectamente complementario a las mutaciones c.1199+17G>A o c.1199+20G>C favorece en cada caso la inclusión del exón (**Fig 22**).

Nuestros resultados concuerdan con estudios previos en los que Hwang y Cohen demostraron que los sitios de unión para U1 dentro tanto de los exones como de los intrones pueden actuar como potenciadores de *splicing*, compensando los sitios 3' de *splicing* débiles (Hwang and Cohen 1996a). Además, U1 puede unirse a diferentes sitios y contribuir a la definición del exón favoreciendo la elección mediada por U6 del sitio 5' de *splicing* más próximo (Hwang and Cohen 1996b). Eperon et al. encontraron que U1 se puede unir simultáneamente a sitios 5' de *splicing* alternativos, usando SRSF1 como potenciador, y, con una ocupación simultánea, el sitio 5' de *splicing* en posición corriente abajo se usa de manera preferente, cuando la distancia entre los sitios 5' era mayor de 40 nucleótidos (Eperon et al. 1993). En nuestro estudio, también observamos el uso del sitio 5' críptico de *splicing* al aumentar la distancia al sitio natural (**Fig. 21**). Otro estudio señaló el papel de hnRNP A1 con un efecto antagónico, interfiriendo con la unión de U1 y, en ese caso, se demostró que la elección del sitio de *splicing* dependía de las afinidades de U1 para cada sitio (Eperon et al. 2000). Acorde con este estudio, nuestros ensayos de afinidad indicaron un aumento de la unión de hnRNP A1 a la secuencia mutante c.1199+20G>C, lo que explicaría el efecto más grave de este mutante en relación con el mutante c.1199+17G>A, a pesar de su efecto aparentemente menos dramático en la fuerza de unión de U1 (**Fig. 16**). De hecho, según las predicciones *in silico* el cambio c.1199+20G>C aumentaría la fuerza del sitio de unión hnRNP A1 (+1.36% según HSF) mientras que el cambio c.1199+17G>A suprimiría dos sitios de unión hnRNP A1, aunque crearía uno nuevo (**Tabla 13**).

Pagani y sus colaboradores identificaron a U1-70K como mediador en el rescate del *splicing* por ExSpeU1 (Rogalska et al. 2016). Se sabe que la proteína U1-70K interactúa con las proteínas SR a través de su dominio RS, favoreciendo la inclusión del exón (Cho et al. 2011). Cabe destacar que la corrección del *splicing* mediada por ExSpeU1 parece no requerir un U1 snRNP endógeno (Dal Mas et al. 2015; Rogalska et al. 2016). Esto podría indicar que las partículas tipo U1 no actúan facilitando el reclutamiento del U1 endógeno a los sitios 5' de *splicing* corriente arriba (*upstream*), sino promoviendo la correcta definición de exones e intrones, principalmente a través de los elementos U1-70K y de la horquilla IV del snRNA, respectivamente (Rogalska et al. 2016). En nuestro caso, el mecanismo de acción podría ser similar; la proteína U1-70K se une al U1 snRNA unido a su vez a la región intrónica corriente abajo del sitio 5' de *splicing* canónico, iniciando el reclutamiento de los factores de *splicing* sobre el exón. Los U1 adaptados que se unen a los sitios intrónicos mutantes c.1199+17G>A o c.1199+20G>C (**Fig. 22**) compensan el efecto de dichas mutaciones reclutando la proteína U1-70K, y reconstituyendo así las interacciones perdidas que definen el exón 11.

Un estudio reciente demostró que la completa recuperación de mutaciones de *splicing* causantes de enfermedad en el exón 5 del factor de coagulación IX (FIX) por ExSpeU1 snRNA está mediado por un mecanismo dependiente de SRSF2 (Tajnik et al. 2016). SRSF2 muestra una unión débil a la región del intrón 11 de la *PAH* wt, que se suprime con las mutaciones c.1199+17G>A o c.1199+20G>C (**Fig. 19**), evidenciando su posible participación en la definición correcta del exón, que se confirma con una recuperación parcial del *splicing* para la mutación +17a tras su sobreexpresión (**Fig. 18**). También detectamos un aumento en la unión de la proteína hnRNP A1 inhibidora del *splicing* a la secuencia mutante +20c (**Fig. 19**), lo que también podría contribuir al efecto de exclusión del exón. Especulamos que existe un equilibrio entre la unión inhibitoria de hnRNP A1 a los sitios de unión de la región comprendida entre los nucleótidos +14 y +32 (**Fig. 19**), y la unión de U1 al sitio crítico de *splicing*. En condiciones normales, una de las funciones de la unión de U1 al sitio crítico podría ser evitar la unión inhibitoria de hnRNP A1 a los sitios de unión localizados entre los nucleótidos +14 y +32. Por lo tanto, son varios los mecanismos reguladores que pueden actuar en equilibrio para la correcta definición del exón y mediar en el efecto patogénico de las variantes descritas.

En resumen, este trabajo nos ha permitido determinar el mecanismo molecular por el que nuevas variantes intrónicas en los genes *PTS* (c.164-672C>T y c.243+3A>G) y *PAH* (c.1199+17G>A o c.1199+20G>C) producen una alteración en el procesamiento del pre-mRNA, proporcionando evidencias para comprender los mecanismos que determinan la correcta definición de un exón mediante la participación de elementos reguladores de *splicing* y arrojando luz sobre el mecanismo de acción de ExSpeU1, al demostrar que, en ciertos contextos, U1 snRNP puede actuar como un

potenciador de *splicing* cuando se une a una región intrónica que flanquea el sitio 5' natural de *splicing*. Así mismo, este trabajo contribuye a la idea del uso de las herramientas bioinformáticas como una primera aproximación y no como una estrategia determinante para la caracterización de nuevas variantes, ya que no son capaces de predecir con precisión los defectos de *splicing*. Como se ha comentado anteriormente, el mecanismo de *splicing* no solo se determina por las secuencias consenso y los elementos reguladores localizados en los exones e intrones, sino también por factores celulares y específicos del tejido (Wai et al. 2019), que un programa bioinformático no puede tener en cuenta; de ahí la necesidad de un estudio funcional.

Por otra parte, en este trabajo se aportan nuevas evidencias de que los defectos de *splicing* pueden ser al menos parcialmente corregidos bien mediante la terapia antisentido o bien mediante la sobreexpresión de U1 snRNAs modificados. Teniendo en cuenta el creciente conocimiento a nivel molecular de las enfermedades, el tratamiento está avanzando hacia una terapia personalizada cada vez mayor. Este tipo de mutaciones representa un excelente ejemplo de diana molecular para terapias de RNA específicas de mutación.

CONCLUSIONES

- 1 Este trabajo aporta nuevas evidencias de que los análisis *in silico* mediante el uso de herramientas bioinformáticas no son suficientes para determinar la implicación de las variantes en defectos de *splicing* ni para elucidar el mecanismo molecular subyacente, siendo necesario un análisis del perfil transcripcional en muestras del paciente o en su defecto el uso de un sistema *ex vivo* de minigenes para confirmar las predicciones.
- 2 Nuestros resultados han confirmado la patogenicidad a través de un defecto de *splicing* de las variantes c.243+3A>G y c.164-672C>T en el gen *PTS* y c.1199+17G>A y c.1199+20G>C en el gen *PAH* y, descartaron la naturaleza causante de enfermedad de variantes intrónicas profundas recién identificadas en el gen *PAH* por NGS y priorizadas mediante un proceso bioinformático.
- 3 El uso de la terapia antisentido ha demostrado su eficacia para la corrección de defectos de *splicing* en el gen *PTS* como consecuencia de la inclusión de pseudoexones.
- 4 El uso de miMCs como vehículo para la administración de los AONs ha resultado ser una estrategia poco eficiente para modular el *splicing* en el sistema empleado.
- 5 Nuestros resultados amplían el repertorio de funciones de U1 en el proceso de *splicing*, indicando que puede actuar como potenciador de *splicing* uniéndose a regiones intrónicas no canónicas.
- 6 Los datos explican el efecto terapéutico de los U1 snRNA específicos de exón (ExSPeU1) que se han aplicado para mutaciones de *splicing* en modelos celulares y murinos de diferentes enfermedades.

CONCLUSIONS

- 1 This work provides new evidence that *in silico* analyses using bioinformatics tools are not enough to determine the involvement of variants in splicing defects or to elucidate the underlying molecular mechanism, requiring an analysis of the transcriptional profile in patient's samples or an *ex vivo* minigene system to confirm the predictions.
- 2 Our results have confirmed the pathogenicity via a splicing defect of variants c.243+3A>G and c.164-672C>T in the *PTS* gene and c.1199+17G>A and c.1199+20G>C in the *PAH* gene and discarded the disease-causing nature of deep intronic variants in the *PAH* gene newly identified by NGS and prioritized using a bioinformatic pipeline.
- 3 The use of antisense therapy has demonstrated its efficacy for the correction of splicing defects in the *PTS* gene caused by pseudoexons inclusion.
- 4 The use of mi-MC as a vehicle for the AON delivery has turned out to be a low efficient strategy to modulate splicing in the system used.
- 5 Our results extend the repertoire of U1 functions in the splicing process, indicating that it can act as a splicing enhancer by binding to non-canonical intronic regions.
- 6 The data explain the therapeutic effect of exon specific U1 (ExSpeU1) snRNAs that have been used for splicing mutations in cellular and murine models of different diseases.

BIBLIOGRAFÍA

- A**artsma-Rus A., Houlleberghs H., van Deutekom J. C., van Ommen G. J., and t Hoen P. A. (2010). Exonic sequences provide better targets for antisense oligonucleotides than splice site sequences in the modulation of Duchenne muscular dystrophy splicing. *Oligonucleotides*, 20: 69-77.
- Aartsma-Rus A., and Krieg A. M. (2017). FDA Approves Eteplirsen for Duchenne Muscular Dystrophy: The Next Chapter in the Eteplirsen Saga. *Nucleic Acid Ther*, 27: 1-3.
- Aartsma-Rus A., Straub V., Hemmings R., Haas M., Schlosser-Weber G., Stoyanova-Beninska V., Mercuri E., et al. (2017). Development of Exon Skipping Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy: A Critical Review and a Perspective on the Outstanding Issues. *Nucleic Acid Ther*, 27: 251-59.
- Acosta A. X., Silva W. A., Jr., Carvalho T. M., and Zago M. A. (2001). Ten novel mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) observed in Brazilian patients with phenylketonuria. *Hum Mutat*, 17: 77.
- Albert S., Garanto A., Sangermano R., Khan M., Bax N. M., Hoyng C. B., Zernant J., et al. (2018). Identification and Rescue of Splice Defects Caused by Two Neighboring Deep-Intronic ABCA4 Mutations Underlying Stargardt Disease. *Am J Hum Genet*, 102: 517-27.
- Anikster Y., Haack T. B., Vilboux T., Pode-Shakked B., Thony B., Shen N., Guarani V., et al. (2017). Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability. *Am J Hum Genet*, 100: 257-66.
- Ata-Abadi NS Rezaei N, Dormiani K, Nasr-Esfahani MH. (2017). Production of Minicircle DNA Vectors Using Site-Specific Recombinases. *Methods Mol Biol*, 1642: 325-39.
- B**alestra D., Faella A., Margaritis P., Cavallari N., Pagani F., Bernardi F., Arruda V. R., and Pinotti M. (2014). An engineered U1 small nuclear RNA rescues splicing defective coagulation F7 gene expression in mice. *J Thromb Haemost*, 12: 177-85.
- Baralle D., and Buratti E. (2017). RNA splicing in human disease and in the clinic. *Clin Sci (Lond)*, 131: 355-68.
- Baralle F. E., and Giudice J. (2017). Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 437-51.
- Benchaouir R., and Goyenvallé A. (2012). Splicing modulation mediated by small nuclear RNAs as therapeutic approaches for muscular dystrophies. *Curr Gene Ther*, 12: 179-91.
- Bergsma AJ van der Wal E, Broeders M, van der Ploeg AT, Pim Pijnappel WWM. (2017). Alternative Splicing in Genetic Diseases: Improved Diagnosis and Novel Treatment Options. *Int Rev Cell Mol Biol*, 335: 85-141.
- Blau N. (2016). Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Hum Mutat*, 37: 508-15.

- Blau N., Hennermann J. B., Langenbeck U., and Lichter-Konecki U. (2011). Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab*, 104 Suppl: S2-9.
- Blau N., Martinez A., Hoffmann G. F., and Thony B. (2018). DNAJC12 deficiency: A new strategy in the diagnosis of hyperphenylalaninemias. *Mol Genet Metab*, 123: 1-5.
- Blau N., Shen N., and Carducci C. (2014). Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn*, 14: 655-71.
- Blau N., Thöny B., Cotton R., and Hyland K. (2001). Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. *New York: McGraw-Hill*: 1275-776.
- Blau N., van Spronsen F. J., and Levy H. L. (2010). Phenylketonuria. *Lancet*, 376: 1417-27.
- Bonini J., Varilh J., Raynal C., Theze C., Beyne E., Audrezet M. P., Ferec C., et al. (2015). Small-scale high-throughput sequencing-based identification of new therapeutic tools in cystic fibrosis. *Genet Med*, 17: 796-806.
- Bovolenta M., Neri M., Fini S., Fabris M., TrabANELLI C., Venturoli A., Martoni E., et al. (2008). A novel custom high density-comparative genomic hybridization array detects common rearrangements as well as deep intronic mutations in dystrophinopathies. *BMC Genomics*, 9: 572.
- Brasil S., Viecelli H. M., Meili D., Rassi A., Desviat L. R., Perez B., Ugarte M., and Thony B. (2011). Pseudoexon exclusion by antisense therapy in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Hum Mutat*, 32: 1019-27.
- Brun C., Suter D., Pauli C., Dunant P., Lochmuller H., Burgunder J. M., Schumperli D., and Weis J. (2003). U7 snRNAs induce correction of mutated dystrophin pre-mRNA by exon skipping. *Cell Mol Life Sci*, 60: 557-66.
- Burgisser D. M., Thony B., Redweik U., Hess D., Heizmann C. W., Huber R., and Nar H. (1995). 6-Pyruvoyl tetrahydropterin synthase, an enzyme with a novel type of active site involving both zinc binding and an intersubunit catalytic triad motif; site-directed mutagenesis of the proposed active center, characterization of the metal binding site and modelling of substrate binding. *J Mol Biol*, 253: 358-69.
- Byron S. A., Van Keuren-Jensen K. R., Engelthaler D. M., Carpten J. D., and Craig D. W. (2016). Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. *Nat Rev Genet*, 17: 257-71.
- C**ampbell M. A., and Wengel J. (2011). Locked vs. unlocked nucleic acids (LNA vs. UNA): contrasting structures work towards common therapeutic goals. *Chem Soc Rev*, 40: 5680-9.
- Carmel I., Tal S., Vig I., and Ast G. (2004). Comparative analysis detects dependencies among the 5' splice-site positions. *RNA*, 10: 828-40.
- Chen M., and Manley J. L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 741-54.

- Chen Z. Y., He C. Y., Ehrhardt A., and Kay M. A. (2003). Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther*, 8: 495-500.
- Cho S., Hoang A., Sinha R., Zhong X. Y., Fu X. D., Krainer A. R., and Ghosh G. (2011). Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 8233-8.
- Cohen J. B., Snow J. E., Spencer S. D., and Levinson A. D. (1994). Suppression of mammalian 5' splice-site defects by U1 small nuclear RNAs from a distance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 10470-4.
- Concolino D., Mascaro I., Moricca M. T., Bonapace G., Matalon K., Trapasso J., Radhakrishnan G., Ferrara C., Matalon R., and Strisciuglio P. (2017). Long-term treatment of phenylketonuria with a new medical food containing large neutral amino acids. *Eur J Clin Nutr*, 71: 1027.
- Costigan M., Latremoliere A., and Woolf C. J. (2012). Analgesia by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis. *Curr Opin Pharmacol*, 12: 92-9.
- Crooke S. T., Witztum J. L., Bennett C. F., and Baker B. F. (2018). RNA-Targeted Therapeutics. *Cell Metab*, 27: 714-39.
- Cummings B. B., Marshall J. L., Tukiainen T., Lek M., Donkervoort S., Foley A. R., Bolduc V., et al. (2017). Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. *Sci Transl Med*, 9.
- Daguenet E., Dujardin G., and Valcarcel J. (2015). The pathogenicity of splicing defects: mechanistic insights into pre-mRNA processing inform novel therapeutic approaches. *EMBO Rep*, 16: 1640-55.
- Dal Mas A., Rogalska M. E., Bussani E., and Pagani F. (2015). Improvement of SMN2 pre-mRNA processing mediated by exon-specific U1 small nuclear RNA. *Am J Hum Genet*, 96: 93-103.
- Darquet A. M., Cameron B., Wils P., Scherman D., and Crouzet J. (1997). A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther*, 4: 1341-9.
- De Angelis F. G., Sthandier O., Berarducci B., Toso S., Galluzzi G., Ricci E., Cossu G., and Bozzoni I. (2002). Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 9456-61.
- Desviat L. R., Perez B., and Ugarte M. (2012). Minigenes to confirm exon skipping mutations. *Methods Mol Biol*, 867: 37-47.
- Dhir A., and Buratti E. (2010). Alternative splicing: role of pseudoexons in human disease and potential therapeutic strategies. *FEBS J*, 277: 841-55.
- Dietz W. M., Skinner N. E., Hamilton S. E., Jund M. D., Heitfeld S. M., Litterman A. J., Hwu P., et al. (2013). Minicircle DNA is superior to plasmid DNA in eliciting antigen-specific CD8+ T-cell responses. *Mol Ther*, 21: 1526-35.

- Ding Z., Georgiev P., and Thony B. (2006). Administration-route and gender-independent long-term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 13: 587-93.
- Dominski Z., and Kole R. (1993). Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 8673-7.
- Dreyfuss G., Kim V. N., and Kataoka N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 195-205.
- Duell P. B., Santos R. D., Kirwan B. A., Witztum J. L., Tsimikas S., and Kastelein J. J. P. (2016). Long-term mipomersen treatment is associated with a reduction in cardiovascular events in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*, 10: 1011-21.
- E**gloff S., O'Reilly D., and Murphy S. (2008). Expression of human snRNA genes from beginning to end. *Biochem Soc Trans*, 36: 590-4.
- El-Hattab A. W. (2015). Inborn errors of metabolism. *Clin Perinatol*, 42: 413-39, x.
- Eperon I. C., Ireland D. C., Smith R. A., Mayeda A., and Krainer A. R. (1993). Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF. *EMBO J*, 12: 3607-17.
- Eperon I. C., Makarova O. V., Mayeda A., Munroe S. H., Caceres J. F., Hayward D. G., and Krainer A. R. (2000). Selection of alternative 5' splice sites: role of U1 snRNP and models for the antagonistic effects of SF2/ASF and hnRNP A1. *Mol Cell Biol*, 20: 8303-18.
- Evers M. M., Toonen L. J., and van Roon-Mom W. M. (2015). Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Adv Drug Deliv Rev*, 87: 90-103.
- Ezgu F. (2016). Inborn Errors of Metabolism. *Adv Clin Chem*, 73: 195-250.
- F**aa V., Incani F., Meloni A., Corda D., Masala M., Baffico A. M., Seia M., Cao A., and Rosatelli M. C. (2009). Characterization of a disease-associated mutation affecting a putative splicing regulatory element in intron 6b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J Biol Chem*, 284: 30024-31.
- Falkenberg K. D., Braverman N. E., Moser A. B., Steinberg S. J., Klouwer F. C. C., Schluter A., Ruiz M., et al. (2017). Allelic Expression Imbalance Promoting a Mutant PEX6 Allele Causes Zellweger Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet*, 101: 965-76.
- Fang L. J., Simard M. J., Vidaud D., Assouline B., Lemieux B., Vidaud M., Chabot B., and Thirion J. P. (2001). A novel mutation in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promotes skipping of two exons by preventing exon definition. *J Mol Biol*, 307: 1261-70.
- Ferguson DP Dangott LJ, Lightfoot JT. (2014). Lessons learned from vivo-morpholinos: How to avoid vivo-morpholino toxicity. *Biotechniques*, 56: 251-56.

- Fernandez-Lainez C., Ibarra-Gonzalez I., Alcantara-Ortigoza M. A., Fernandez-Hernandez L., Enriquez-Flores S., Gonzalez-Del Angel A., Blau N., et al. (2018). Mutational spectrum of PTS gene and in silico pathological assessment of a novel variant in Mexico. *Brain Dev*, 40: 530-36.
- Fernandez Alanis E., Pinotti M., Dal Mas A., Balestra D., Cavallari N., Rogalska M. E., Bernardi F., and Pagani F. (2012). An exon-specific U1 small nuclear RNA (snRNA) strategy to correct splicing defects. *Hum Mol Genet*, 21: 2389-98.
- Finkel R. S., Mercuri E., Darras B. T., Connolly A. M., Kuntz N. L., Kirschner J., Chiriboga C. A., et al. (2017). Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*, 377: 1723-32.
- Fogg J. M., Kolmakova N., Rees I., Magonov S., Hansma H., Perona J. J., and Zechiedrich E. L. (2006). Exploring writhe in supercoiled minicircle DNA. *J Phys Condens Matter*, 18: S145-S59.
- Freund M., Hicks M. J., Konermann C., Otte M., Hertel K. J., and Schaal H. (2005). Extended base pair complementarity between U1 snRNA and the 5' splice site does not inhibit splicing in higher eukaryotes, but rather increases 5' splice site recognition. *Nucleic Acids Res*, 33: 5112-9.
- Fusetti F., Erlandsen H., Flatmark T., and Stevens R. C. (1998). Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem*, 273: 16962-7.
- Gallego-Villar L., Vieceilli H. M., Perez B., Harding C. O., Ugarte M., Thony B., and Desviat L. R. (2014). A sensitive assay system to test antisense oligonucleotides for splice suppression therapy in the mouse liver. *Mol Ther Nucleic Acids*, 3: e193.
- Geary R. S., Norris D., Yu R., and Bennett C. F. (2015). Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*, 87: 46-51.
- Geib T., and Hertel K. J. (2009). Restoration of full-length SMN promoted by adenoviral vectors expressing RNA antisense oligonucleotides embedded in U7 snRNAs. *PLoS One*, 4: e8204.
- Godfrey C., Desviat L. R., Smedsrod B., Pietri-Rouxel F., Denti M. A., Disterer P., Lorain S., et al. (2017). Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies. *EMBO Mol Med*, 9: 545-57.
- Gorman L., Suter D., Emerick V., Schumperli D., and Kole R. (1998). Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 4929-34.
- Goyenvallé A., Babbs A., Wright J., Wilkins V., Powell D., Garcia L., and Davies K. E. (2012). Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Hum Mol Genet*, 21: 2559-71.
- Goyenvallé A., Vulin A., Fougérousse F., Leturcq F., Kaplan J. C., Garcia L., and Danos O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*, 306: 1796-9.

- Goyenvallé A., Wright J., Babbs A., Wilkins V., Garcia L., and Davies K. E. (2012). Engineering multiple U7snRNA constructs to induce single and multiexon-skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*, 20: 1212-21.
- Grodecka L., Kovacova T., Kramarek M., Seneca S., Stouffs K., De Laet C., Majer F., et al. (2017). Detailed molecular characterization of a novel IDS exonic mutation associated with multiple pseudoexon activation. *J Mol Med (Berl)*, 95: 299-309.
- Gueant J. L., Chery C., Oussalah A., Nadaf J., Coelho D., Josse T., Flayac J., et al. (2018). Publisher Correction: A PRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblC patients. *Nat Commun*, 9: 554.
- Guldborg P., Levy H. L., Hanley W. B., Koch R., Matalon R., Rouse B. M., Trefz F., de la Cruz F., Henriksen K. F., and Guttler F. (1996). Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Am J Hum Genet*, 59: 84-94.
- H**avens M. A., and Hastings M. L. (2016). Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Res*, 44: 6549-63.
- Hegyí E., Geisz A., Sahin-Toth M., Derikx M. H., Nemeth B. C., Balazs A., Hritz I., et al. (2016). SPINK1 Promoter Variants in Chronic Pancreatitis. *Pancreas*, 45: 148-53.
- Heintz C., Dobrowolski S. F., Andersen H. S., Demirkol M., Blau N., and Andresen B. S. (2012). Splicing of phenylalanine hydroxylase (PAH) exon 11 is vulnerable: molecular pathology of mutations in PAH exon 11. *Mol Genet Metab*, 106: 403-11.
- Hodges E., Xuan Z., Baliya V., Kramer M., Molla M. N., Smith S. W., Middle C. M., et al. (2007). Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nat Genet*, 39: 1522-7.
- Holstein M., Mesa-Nunez C., Miskey C., Almarza E., Poletti V., Schmeer M., Grueso E., et al. (2018). Efficient Non-viral Gene Delivery into Human Hematopoietic Stem Cells by Minicircle Sleeping Beauty Transposon Vectors. *Mol Ther*, 26: 1137-53.
- Hori T., Fukao T., Murase K., Sakaguchi N., Harding C. O., and Kondo N. (2013). Molecular basis of two-exon skipping (exons 12 and 13) by c.1248+5g>a in OXCT1 gene: study on intermediates of OXCT1 transcripts in fibroblasts. *Hum Mutat*, 34: 473-80.
- Hsiao Y. H., Bahn J. H., Lin X., Chan T. M., Wang R., and Xiao X. (2016). Alternative splicing modulated by genetic variants demonstrates accelerated evolution regulated by highly conserved proteins. *Genome Res*, 26: 440-50.
- Huang Y. (2017). Preclinical and Clinical Advances of GalNAc-Decorated Nucleic Acid Therapeutics. *Mol Ther Nucleic Acids*, 6: 116-32.
- Hwang D. Y., and Cohen J. B. (1996a). Base pairing at the 5' splice site with U1 small nuclear RNA promotes splicing of the upstream intron but may be dispensable for slicing of the downstream intron. *Mol Cell Biol*, 16: 3012-22.

- Hwang D. Y., and Cohen J. B. (1996b). U1 snRNA promotes the selection of nearby 5' splice sites by U6 snRNA in mammalian cells. *Genes Dev*, 10: 338-50.
- Hwang D. Y., and Cohen J. B. (1997). U1 small nuclear RNA-promoted exon selection requires a minimal distance between the position of U1 binding and the 3' splice site across the exon. *Mol Cell Biol*, 17: 7099-107.
- I**mbert M., Dias-Florencio G., and Goyenvallé A. (2017). Viral Vector-Mediated Antisense Therapy for Genetic Diseases. *Genes (Basel)*, 8.
- J**affe E. K. (2017). New protein structures provide an updated understanding of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 121: 289-96.
- K**ay M. A., He C. Y., and Chen Z. Y. (2010). A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nat Biotechnol*, 28: 1287-9.
- Keren H., Lev-Maor G., and Ast G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet*, 11: 345-55.
- Kobe B., Jennings I. G., House C. M., Michell B. J., Goodwill K. E., Santarsiero B. D., Stevens R. C., Cotton R. G., and Kemp B. E. (1999). Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Biol*, 6: 442-8.
- Kole R., Krainer A. R., and Altman S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov*, 11: 125-40.
- Kotterman M. A., and Schaffer D. V. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet*, 15: 445-51.
- Krawczak M., Thomas N. S., Hundrieser B., Mort M., Wittig M., Hampe J., and Cooper D. N. (2007). Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat*, 28: 150-8.
- Kremer L. S., Bader D. M., Mertes C., Kopajtich R., Pichler G., Iuso A., Haack T. B., et al. (2017). Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nat Commun*, 8: 15824.
- Kure S., Hou D. C., Ohura T., Iwamoto H., Suzuki S., Sugiyama N., Sakamoto O., Fujii K., Matsubara Y., and Narisawa K. (1999). Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr*, 135: 375-8.
- L**e Guedard-Mereuze S., Vache C., Molinari N., Vaudaine J., Claustres M., Roux A. F., and Tuffery-Giraud S. (2009). Sequence contexts that determine the pathogenicity of base substitutions at position +3 of donor splice-sites. *Hum Mutat*, 30: 1329-39.
- Lee N. C., Lee Y. M., Chen P. W., Byrne B. J., and Hwu W. L. (2016). Mutation-adapted U1 snRNA corrects a splicing error of the dopa decarboxylase gene. *Hum Mol Genet*, 25: 5142-47.
- Lee Y., and Rio D. C. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem*, 84: 291-323.

- Leuzzi V., Carducci C. A., Carducci C. L., Pozzessere S., Burlina A., Cerone R., Concolino D., et al. (2010). Phenotypic variability, neurological outcome and genetics background of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Clin Genet*, 77: 249-57.
- Levin A. A. (2019). Treating Disease at the RNA Level with Oligonucleotides. *N Engl J Med*, 380: 57-70.
- Liquori A., Vache C., Baux D., Blanchet C., Hamel C., Malcolm S., Koenig M., Claustres M., and Roux A. F. (2016). Whole USH2A Gene Sequencing Identifies Several New Deep Intronic Mutations. *Hum Mutat*, 37: 184-93.
- Liu H. X., Zhang M., and Krainer A. R. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev*, 12: 1998-2012.
- Liu T. T., Chang Y. H., Chiang S. H., Yang Y. L., Yu W. M., and Hsiao K. J. (2001). Identification of three novel 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase gene mutations (226C>T, IVS3+1G>A, 116-119delTGTT) in Chinese hyperphenylalaninemia caused by tetrahydrobiopterin synthesis deficiency. *Hum Mutat*, 18: 83.
- Longo N. (2009). Disorders of biopterin metabolism. *J Inherit Metab Dis*, 32: 333-42.
- Longo N., Harding C. O., Burton B. K., Grange D. K., Vockley J., Wasserstein M., Rice G. M., et al. (2014). Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 384: 37-44.
- Longo N., Zori R., Wasserstein M. P., Vockley J., Burton B. K., Decker C., Li M., et al. (2018). Long-term safety and efficacy of pegvaliase for the treatment of phenylketonuria in adults: combined phase 2 outcomes through PAL-003 extension study. *Orphanet J Rare Dis*, 13: 108.
- Lopez-Bigas N., Audit B., Ouzounis C., Parra G., and Guigo R. (2005). Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett*, 579: 1900-3.
- Madsen P. P., Kibaek M., Roca X., Sachidanandam R., Krainer A. R., Christensen E., Steiner R. D., et al. (2006). Short/branched-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency due to an IVS3+3A>G mutation that causes exon skipping. *Hum Genet*, 118: 680-90.
- Manning K. S., and Cooper T. A. (2017). The roles of RNA processing in translating genotype to phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 102-14.
- Matalon R., Michals-Matalon K., Bhatia G., Grechanina E., Novikov P., McDonald J. D., Grady J., Tying S. K., and Guttler F. (2006). Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis*, 29: 732-8.
- Matos L., Canals I., Dridi L., Choi Y., Prata M. J., Jordan P., Desviat L. R., et al. (2014). Therapeutic strategies based on modified U1 snRNAs and chaperones for Sanfilippo C splicing mutations. *Orphanet J Rare Dis*, 9: 180.

- Meili D., Kralovicova J., Zagalak J., Bonafe L., Fiori L., Blau N., Thony B., and Vorechovsky I. (2009). Disease-causing mutations improving the branch site and polypyrimidine tract: pseudoexon activation of LINE-2 and antisense Alu lacking the poly(T)-tail. *Hum Mutat*, 30: 823-31.
- Mitchell J. J., Trakadis Y. J., and Scriver C. R. (2011). Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med*, 13: 697-707.
- Monjezi R., Miskey C., Gogishvili T., Schleef M., Schmeer M., Einsele H., Ivics Z., and Hudecek M. (2017). Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors. *Leukemia*, 31: 186-94.
- Montes M., Sanford B. L., Comiskey D. F., and Chandler D. S. (2019). RNA Splicing and Disease: Animal Models to Therapies. *Trends Genet*, 35: 68-87.
- Morava E., Rahman S., Peters V., Baumgartner M. R., Patterson M., and Zschocke J. (2015). Quo vadis: the re-definition of "inborn metabolic diseases". *J Inherit Metab Dis*, 38: 1003-6.
- N**an Y., and Zhang Y. J. (2018). Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers as Novel Antiviral Compounds. *Front Microbiol*, 9: 750.
- Navarrete R., Leal F., Vega A. I., Morais-Lopez A., Garcia-Silva M. T., Martin-Hernandez E., Quijada-Fraile P., et al. (2019). Value of genetic analysis for confirming inborn errors of metabolism detected through the Spanish neonatal screening program. *Eur J Hum Genet*.
- Nielsen K. B., Sorensen S., Cartegni L., Corydon T. J., Doktor T. K., Schroeder L. D., Reinert L. S., et al. (2007). Seemingly neutral polymorphic variants may confer immunity to splicing-inactivating mutations: a synonymous SNP in exon 5 of MCAD protects from deleterious mutations in a flanking exonic splicing enhancer. *Am J Hum Genet*, 80: 416-32.
- Niu D. M. (2011). Disorders of BH4 metabolism and the treatment of patients with 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency in Taiwan. *Brain Dev*, 33: 847-55.
- O**dermatt P., Trub J., Furrer L., Fricker R., Marti A., and Schumperli D. (2016). Somatic Therapy of a Mouse SMA Model with a U7 snRNA Gene Correcting SMN2 Splicing. *Mol Ther*, 24: 1797-805.
- Oleggini R., Bertelli R., Di Donato A., Di Duca M., Caridi G., Sanna-Cherchi S., Scolari F., et al. (2006). Rare functional variants of podocin (NPHS2) promoter in patients with nephrotic syndrome. *Gene Expr*, 13: 59-66.
- Oppliger T., Thony B., Nar H., Burgisser D., Huber R., Heizmann C. W., and Blau N. (1995). Structural and functional consequences of mutations in 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase causing hyperphenylalaninemia in humans. Phosphorylation is a requirement for in vivo activity. *J Biol Chem*, 270: 29498-506.
- Ottesen E. W. (2017). ISS-N1 makes the First FDA-approved Drug for Spinal Muscular Atrophy. *Transl Neurosci*, 8: 1-6.

- Palhais B., Dembic M., Sabaratnam R., Nielsen K. S., Doktor T. K., Bruun G. H., and Andresen B. S. (2016). The prevalent deep intronic c. 639+919 G>A GLA mutation causes pseudoexon activation and Fabry disease by abolishing the binding of hnRNPA1 and hnRNP A2/B1 to a splicing silencer. *Mol Genet Metab*, 119: 258-69.
- Pampols T. (2010). Inherited metabolic rare disease. *Adv Exp Med Biol*, 686: 397-431.
- Pascucci T., Rossi L., Colamartino M., Gabucci C., Carducci C., Valzania A., Sasso V., et al. (2018). A new therapy prevents intellectual disability in mouse with phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 124: 39-49.
- Perez B., Rodriguez-Pascau L., Vilageliu L., Grinberg D., Ugarte M., and Desviat L. R. (2010). Present and future of antisense therapy for splicing modulation in inherited metabolic disease. *J Inherit Metab Dis*, 33: 397-403.
- Pey A. L., Ying M., Cremades N., Velazquez-Campoy A., Scherer T., Thony B., Sancho J., and Martinez A. (2008). Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J Clin Invest*, 118: 2858-67.
- Pinotti M., Rizzotto L., Balestra D., Lewandowska M. A., Cavallari N., Marchetti G., Bernardi F., and Pagani F. (2008). U1-snRNA-mediated rescue of mRNA processing in severe factor VII deficiency. *Blood*, 111: 2681-4.
- Popp M. W., and Maquat L. E. (2013). Organizing principles of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Annu Rev Genet*, 47: 139-65.
- Rajabi F., and Levy H. L. (2015). Hyperphenylalaninemia and the genomic revolution. *Mol Genet Metab*, 114: 380-1.
- Ray K. K., Landmesser U., Leiter L. A., Kallend D., Dufour R., Karakas M., Hall T., et al. (2017). Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med*, 376: 1430-40.
- Rebuffat A., Harding C. O., Ding Z., and Thony B. (2010). Comparison of adeno-associated virus pseudotype 1, 2, and 8 vectors administered by intramuscular injection in the treatment of murine phenylketonuria. *Hum Gene Ther*, 21: 463-77.
- Richardson S. R., Doucet A. J., Kopera H. C., Moldovan J. B., Garcia-Perez J. L., and Moran J. V. (2015). The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiol Spectr*, 3: MDNA3-0061-2014.
- Rigo F., Seth P. P., and Bennett C. F. (2014). Antisense oligonucleotide-based therapies for diseases caused by pre-mRNA processing defects. *Adv Exp Med Biol*, 825: 303-52.
- Rizzo J. M., and Buck M. J. (2012). Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5: 887-900.
- Roca X., Akerman M., Gaus H., Berdeja A., Bennett C. F., and Krainer A. R. (2012). Widespread recognition of 5' splice sites by noncanonical base-pairing to U1 snRNA involving bulged nucleotides. *Genes Dev*, 26: 1098-109.

- Roca X., Krainer A. R., and Eperon I. C. (2013). Pick one, but be quick: 5' splice sites and the problems of too many choices. *Genes Dev*, 27: 129-44.
- Roca X., Olson A. J., Rao A. R., Enerly E., Kristensen V. N., Borresen-Dale A. L., Andresen B. S., Krainer A. R., and Sachidanandam R. (2008). Features of 5'-splice-site efficiency derived from disease-causing mutations and comparative genomics. *Genome Res*, 18: 77-87.
- Rogalska M. E., Tajnik M., Licastro D., Bussani E., Camparini L., Mattioli C., and Pagani F. (2016). Therapeutic activity of modified U1 core spliceosomal particles. *Nat Commun*, 7: 11168.
- S**anger F., Nicklen S., and Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74: 5463-7.
- Santos-Sierra S., Kirchmair J., Perna A. M., Reiss D., Kemter K., Roschinger W., Glossmann H., et al. (2012). Novel pharmacological chaperones that correct phenylketonuria in mice. *Hum Mol Genet*, 21: 1877-87.
- Sanz D. J., Hollywood J. A., Scallan M. F., and Harrison P. T. (2017). Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis-causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA. *PLoS One*, 12: e0184009.
- Scalet D., Maestri I., Branchini A., Bernardi F., Pinotti M., and Balestra D. (2019). Disease-causing variants of the conserved +2T of 5' splice sites can be rescued by engineered U1snRNAs. *Hum Mutat*, 40: 48-52.
- Schindeler S., Ghosh-Jerath S., Thompson S., Rocca A., Joy P., Kemp A., Rae C., Green K., Wilcken B., and Christodoulou J. (2007). The effects of large neutral amino acid supplements in PKU: an MRS and neuropsychological study. *Mol Genet Metab*, 91: 48-54.
- Schumperli D., and Pillai R. S. (2004). The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell Mol Life Sci*, 61: 2560-70.
- Scotti M. M., and Swanson M. S. (2016). RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet*, 17: 19-32.
- Sharma V. K., and Watts J. K. (2015). Oligonucleotide therapeutics: chemistry, delivery and clinical progress. *Future Med Chem*, 7: 2221-42.
- Sibley C. R., Blazquez L., and Ule J. (2016). Lessons from non-canonical splicing. *Nat Rev Genet*, 17: 407-21.
- Singh R. K., and Cooper T. A. (2012). Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med*, 18: 472-82.
- Sinha R., Kim Y. J., Nomakuchi T., Sahashi K., Hua Y., Rigo F., Bennett C. F., and Krainer A. R. (2018). Antisense oligonucleotides correct the familial dysautonomia splicing defect in IKBKAP transgenic mice. *Nucleic Acids Res*, 46: 4833-44.
- Sorek R. (2007). The birth of new exons: mechanisms and evolutionary consequences. *RNA*, 13: 1603-8.

- Souza C. A. A., Alves M. R. A., Soares R. D. L., Kanufre V. C., Rodrigues V. M., Norton R. C., Starling A. L. P., and Aguiar M. J. B. (2018). BH4 deficiency identified in a neonatal screening program for hyperphenylalaninemia. *J Pediatr (Rio J)*, 94: 170-76.
- Stenler S., Blomberg P., and Smith C. I. (2014). Safety and efficacy of DNA vaccines: plasmids vs. minicircles. *Hum Vaccin Immunother*, 10: 1306-8.
- Stenler S., Wiklander O. P., Badal-Tejedor M., Turunen J., Nordin J. Z., Hallengard D., Wahren B., et al. (2014). Micro-minicircle Gene Therapy: Implications of Size on Fermentation, Complexation, Shearing Resistance, and Expression. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2: e140.
- Strisciuglio P., and Concolino D. (2014). New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites*, 4: 1007-17.
- Sugo T., Terada M., Oikawa T., Miyata K., Nishimura S., Kenjo E., Ogasawara-Shimizu M., et al. (2016). Development of antibody-siRNA conjugate targeted to cardiac and skeletal muscles. *J Control Release*, 237: 1-13.
- Swayze E. E., Siwkowski A. M., Wancewicz E. V., Migawa M. T., Wyrzykiewicz T. K., Hung G., Monia B. P., and Bennett C. F. (2007). Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res*, 35: 687-700.
- Therapeutic Strategies to Rescue Factor IX Variants That Affect Splicing and Protein Function. *PLoS Genet*, 12: e1006082.
- Tanner G., Glaus E., Barthelmes D., Ader M., Fleischhauer J., Pagani F., Berger W., and Neidhardt J. (2009). Therapeutic strategy to rescue mutation-induced exon skipping in rhodopsin by adaptation of U1 snRNA. *Hum Mutat*, 30: 255-63.
- Thomas J., Levy H., Amato S., Vockley J., Zori R., Dimmock D., Harding C. O., et al. (2018). Pegvaliase for the treatment of phenylketonuria: Results of a long-term phase 3 clinical trial program (PRISM). *Mol Genet Metab*, 124: 27-38.
- Thony B., Auerbach G., and Blau N. (2000). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*, 347 Pt 1: 1-16.
- Thony B., and Blau N. (2006). Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. *Hum Mutat*, 27: 870-8.
- Trujillano D., Perez B., Gonzalez J., Tornador C., Navarrete R., Escaramis G., Ossowski S., et al. (2014). Accurate molecular diagnosis of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-deficient hyperphenylalaninemias using high-throughput targeted sequencing. *Eur J Hum Genet*, 22: 528-34.

Tajnik M., Rogalska M. E., Bussani E., Barbon E., Balestra D., Pinotti M., and Pagani F. (2016). Molecular Basis and

- Underhaug J., Aubi O., and Martinez A. (2012). Phenylalanine hydroxylase misfolding and pharmacological chaperones. *Curr Top Med Chem*, 12: 2534-45.
- Van der Wal E., Bergsma A. J., Pijnenburg J. M., van der Ploeg A. T., and Pijnappel Wwmp. (2017). Antisense Oligonucleotides Promote Exon Inclusion and Correct the Common c.-32-13T>G GAA Splicing Variant in Pompe Disease. *Mol Ther Nucleic Acids*, 7: 90-100.
- van der Woerd W. L., Mulder J., Pagani F., Beuers U., Houwen R. H., and van de Graaf S. F. (2015). Analysis of aberrant pre-messenger RNA splicing resulting from mutations in ATP8B1 and efficient in vitro rescue by adapted U1 small nuclear RNA. *Hepatology*, 61: 1382-91.
- van Spronsen F. J., van Wegberg A. M., Ahring K., Belanger-Quintana A., Blau N., Bosch A. M., Burlina A., et al. (2017). Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 5: 743-56.
- van Wegberg A. M. J., MacDonald A., Ahring K., Belanger-Quintana A., Blau N., Bosch A. M., Burlina A., et al. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet J Rare Dis*, 12: 162.
- Vasquez-Vivar J., Shi Z., Luo K., Thirugnanam K., and Tan S. (2017). Tetrahydrobiopterin in antenatal brain hypoxia-ischemia-induced motor impairments and cerebral palsy. *Redox Biol*, 13: 594-99.
- Vaz-Drago R., Custodio N., and Carmo-Fonseca M. (2017). Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet*, 136: 1093-111.
- Viecelli H. M., Harbottle R. P., Wong S. P., Schlegel A., Chuah M. K., VandenDriessche T., Harding C. O., and Thony B. (2014). Treatment of phenylketonuria using minicircle-based naked-DNA gene transfer to murine liver. *Hepatology*, 60: 1035-43.
- Villiger L., Grisch-Chan H. M., Lindsay H., Ringnalda F., Pogliano C. B., Allegri G., Fingerhut R., et al. (2018). Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice. *Nat Med*, 24: 1519-25.
- Vorechovsky I. (2010). Transposable elements in disease-associated cryptic exons. *Hum Genet*, 127: 135-54.
- Wai H., Douglas A. G. L., and Baralle D. (2019). RNA splicing analysis in genomic medicine. *Int J Biochem Cell Biol*, 108: 61-71.
- Walter J. H., Lachmann R. H., and Burgard P. (2012). Hyperphenylalaninaemia. in J.M. Saudubray, G. Van den Berghe and J. H. Walter (eds.), *Inborn Metabolic Diseases* (Berlin: Springer).
- Wang Z., Gerstein M., and Snyder M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10: 57-63.

Wettstein S., Underhaug J., Perez B., Marsden B. D., Yue W. W., Martinez A., and Blau N. (2015). Linking genotypes database with locus-specific database and genotype-phenotype correlation in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet*, 23: 302-9.

Xiong H. Y., Alipanahi B., Lee L. J., Bretschneider H., Merico D., Yuen R. K., Hua Y., et al. (2015). RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science*, 347: 1254806.

Xu S., Luk K., Yao Q., Shen A. H., Zeng J., Wu Y., Luo H. Y., et al. (2019). Editing

aberrant splice sites efficiently restores beta-globin expression in beta-thalassemia. *Blood*.

Yan C Wan R, Shi Y. (2019). Molecular Mechanisms of pre-mRNA Splicing through Structural Biology of the Spliceosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11: a032409.

Zhao N., Fogg J. M., Zechiedrich L., and Zu Y. (2011). Transfection of shRNA-encoding Minivector DNA of a few hundred base pairs to regulate gene expression in lymphoma cells. *Gene Ther*, 18: 220-4.

PUBLICACIONES

Parte de este trabajo queda recogido en la siguiente publicación:

Martinez-Pizarro A., Dembic M., Perez B., Andresen B.S., Desviat L.R. (2018). Intronic *PAH* gene mutations cause a splicing defect by a novel mechanism involving U1snRNP binding downstream of the 5' splice site. *PLoS Genet*, 14: e1007360.